Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Georg-August-Universität Göttingen

Enzymatische Untersuchungen an Grünalgen bei verschiedenen Formen der Kohlenstoffernährung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Winfried Huth
aus Göttingen

Göttingen
1965

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Georg-August-Universität Göttingen

Enzymatische Untersuchungen an Grünalgen bei verschiedenen Formen der Kohlenstoffernährung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Winfried Huth
aus Göttingen

Göttingen
1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

D 7

Referent: Professor Dr. A. Pirson
Korreferent: Professor Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 1965

Inhalt

I. Einleitung

II. Methodik

1. Anzucht der Versuchsobjekte

2. Aufschluß der Algen

a) Aufschluß im Homogenisator nach MERKENSCHLAGER

b) Homogenisierung im Mörser

3. Bestimmungsmethoden

4. Fermenttests

III. Versuche und Ergebnisse

1. Chlorella pyrenoidosa CHICK

a) Wachstum der Kulturen

b) Spezifische Fermentaktivitäten

c) Fermentaktivitäten in Beziehung zum Chlorophyllgehalt

d) Glukosewirkung nach Vorverdunklung

2. Chlorella luteoviridis CHODAT

a) Wachstum der Kulturen

b) Spezifische Fermentaktivitäten

c) Beziehungen zwischen Chlorophyllgehalt und Fermentaktivitäten

3. Euglena gracilis var. bacillaris PRINGSHEIM

a) Wachstum der Kulturen

b) Fermentaktivitäten

4. Chlamydomonas eugametos MOEWUS

a) Wachstum der Kulturen

b) Fermentaktivitäten

5. Prototheca portoricensis var. ciferrii PRINGSHEIM

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung der Ergebnisse

VI. Anhang

VII. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Enzymologische Untersuchungen an Algen liegen seit HOLZERs ersten Fermentbestimmungen an Chlorella pyrenoidosa in großer Zahl vor (HOLZER und HOLZER 1952). Es handelte sich z.T. um orientierende Überprüfungen von Arten, wie bei den Untersuchungen von JACOBI (1957) an Meeresalgen, z.T. um gezielte Vergleiche, wie bei der Arbeit von RICHTER (1959) über die Nachweisbarkeit von Aldolase in Chlorella und Anacystis. Ähnliche Vergleiche liegen bezüglich der Carboxydismutase, der $NADP^{+)}$- und NAD-abhängigen Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase vor (FULLER und GIBBS 1959). Auch andere Schlüsselenzyme des Stoffwechsels haben bereits größeres Interesse gefunden; hier sei der Nachweis der Enzyme des Glyoxylsäurecyclus in Chlorella (WIESSNER und KUHL 1962) und deren Induktion durch Acetat bei Euglena gracilis (OHMANN 1963) erwähnt. Die letzte Arbeit spricht eine für die Algen wie für viele andere Mikroorganismen charakteristische Eigenschaft an, nämlich die Variabilität des stoffwechselphysiologischen Verhaltens und damit zugleich des Ernährungsmodus; für sie sind im Laufe der letzten Jahrzehnte zahlreiche Belege in Wachstumsexperimenten an Algen beigebracht worden (PRINGSHEIM 1959 und 1964). Zu der Plastizität des stoffwechselphysiologischen Verhaltens innerhalb derselben Spezies, wie sie z.B. für Euglena- und Chlorella-Arten bekannt ist, kommen die Besonderheiten in Stoffwechsel und Ernährung, welche für größere Gruppen, Arten oder Stämme spezifisch festgelegt sind.

Ein unter diesen Gesichtspunkten umfassender Vergleich auf enzymologischer Basis ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Er erfordert zweifellos sehr umfangreiche Untersuchungen, bei denen biochemische und physiologische Aspekte in engster Verknüpfung zu berücksichtigen sind.

+) Die im Text verwendeten Abkürzungen werden im Anhang erläutert.

Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag liefern. Er muß bei dem Umfang des Problems notwendigerweise beschränkt sein. Es wurden einige in ihrem ernährungsphysiologischen Verhalten qualitativ und quantitativ verschiedene Typen einzelliger Algen beim Wechsel der Ernährungsform auf das gleichzeitige Verhalten einer Reihe von Fermenten geprüft; dabei wurden Enzyme der Chloroplasten und des cytoplasmatischen Bereichs besonders in Betracht gezogen.

II. Methodik

1. Anzucht der Versuchsobjekte

Versuchsobjekte waren Chlorella pyrenoidosa CHICK, Nr.211-8b, Chlorella luteoviridis CHODAT, Nr.211-2b, Chlamydomonas eugametos MOEWUS, Nr.11-5b, Euglena gracilis PRINGSHEIM, Nr.1224-5/15 und Prototheca portoricensis var. ciferrii PRINGSHEIM, Nr.263-12 aus der Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Institutes Göttingen.

Als Impfmaterial dienten Flüssigkeitskulturen, die bei Tageslicht und Raumtemperatur gewachsen waren. Die Sterilanzucht erfolgte in den von ULRICH (1963) angegebenen Kulturröhren. Sie befanden sich in einem Lichtthermostaten (vgl. KUHL und LORENZEN 1964) bei einer Beleuchtungsstärke von 6000 Lux. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren der Firma Philips (drei TL 40 W-1/32 Warmton DE LUXE, zwei TL 40 W-1/55 Tageslicht). Die Anzuchttemperatur lag bei Chlorella pyrenoidosa bei 30°C, für die anderen Objekte bei 25°C. Begast wurde mit einem CO_2-Luftgemisch (ca. 1,5 Vol.% CO_2).

Das Kulturmedium für die beiden Chlorella-Stämme und Chlamydomonas eugametos ist bei KUHL (1962) angegeben. Jedoch wurden der Phosphat-Puffer und KNO_3 in dreifacher Konzentration gegeben. Prototheca und Euglena gracilis wurden in der von CRAMER und MYERS (1952) angegebenen Nährlösung kultiviert.

Die Nährlösung wurde im Autoklaven sterilisiert. Der EDTA-Eisen- und der Citrat-Eisen-Komplex wurden getrennt autoklaviert. Die Sterilisation der Glukoselösung erfolgte im Dampftopf bei 100°, die der Vitamine B_1 und B_{12} bei 85°C mehrere Stunden.

Soweit nicht besonders angegeben, zogen wir die Algen unter autrophen Bedingungen bis zu einer Dichte, die,

in Küvetten mit einer lichten Weite von 1 cm am Eppendorf-photometer bei einer Wellenlänge von 1014 nm gemessen, einem Wert von E = 0,2 bis 0,3 entsprach. Danach wurde die Kultur unter heterotrophen oder mixotrophen Bedingungen weiter kultiviert.

2. Aufschluß der Algen

a) Homogenisierung im Zellhomogenisator nach MERKENSCHLAGER

Eine annähernd vollständige Zertrümmerung der Algen wurde mit dem Zellhomogenisator der Fa. Braun, Melsungen, erreicht. Die in 20 ml Puffer aufgenommenen Algen wurden mit Glasperlen (0,5 mm Ø) in einer Duranglasflasche unter CO_2-Kühlung 2 min. geschüttelt. Das so gewonnene Gesamthomogenat wurde durch eine Fritte (11 G 2 Schott) von den Glasperlen getrennt. Die Glasperlen wurden mit 5 ml Puffer gewaschen. Waschpuffer und Extrakt wurden vereinigt und 20 min. auf der Christ Ultra-Rapid-Zentrifuge bei 20 000 U/min zentrifugiert. Alle Arbeiten wurden bei Temperaturen von 2 - 5°C ausgeführt. Bei der Verwendung einer Stahlflasche an Stelle des Duranglasgefäßes lagen die gemessenen spez. Aktivitäten der Enzyme niedriger.

b) Aufschluß im Mörser

Eine Homogenisierung im Mörser führte zu keinem quantitativen Zellaufschluß. Der prozentuale Anteil der zertrümmerten Zellen ist abhängig von der Menge des Algenmaterials und der Dauer des Zerreibens. Er liegt im günstigsten Falle zwischen 70 und 80% der Algenmenge. Die mit wenig Puffer in die Reibschale gespülten Algen wurden mit Solidex-Glaspulver G 4 zu einem Brei verrührt und 10 min. zerrieben. Das Homogenat wurde mit 0,1 M Puffer (Tris-HCl-Puffer, pH 7,4) bis zu einem Endvolumen von 15 ml aufgefüllt und wie bereits erwähnt zentrifugiert. Bei der Anwendung dieser

Zertrümmerungsmethode ist darauf geachtet worden, daß immer gleiche Mengen des Untersuchungsmaterials verarbeitet wurden.

Die bei dieser Zertrümmerung benutzte Puffermenge reichte nicht aus, um einen pH-Anstieg während des Zerreibens ganz zu vermeiden. Bei unseren Extrakten stieg der pH-Wert auf ca. 10 bis 11 an. Wie BÖGER (1964) zeigte, beginnt sich oberhalb von pH 10 das Strukturprotein zu lösen. Daher ist es erklärlich, daß trotz des nichtquantitativen Zertrümmerns anteilmäßig mehr Protein im Extrakt nachgewiesen werden konnte als in Extrakten des Zellhomogenisators.

In Tabelle I ist eine Gegenüberstellung von Fermentaktivitäten bei Anwendung beider beschriebenen Homogenisierungsarten dargestellt. Beim Vergleich des Proteingehaltes der Extrakte unter Berücksichtigung des Zertrümmerungsgrades fällt besonders der verhältnismäßig niedrige Wert für die Homogenisierung mit Glasperlen auf. Das läßt darauf schließen, daß ein großer Teil des Eiweißes während des Aufschließens entweder durch lokale Erwärmung oder durch Oxydationsvorgänge ausgefällt wird. Besonders empfindliche Fermenteiweiße können dadurch inaktiviert werden. Zu diesen empfindlichen Enzymen gehören bei allen untersuchten Algen das Zwischenferment und die 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase. Bei Chlorella pyrenoidosa konnte das letztgenannte Ferment nur durch die schonendere Homogenisierung im Mörser erfaßt werden. Ebenso war bei Chlamydomonas das Zwischenferment nur in Mörserextrakten nachzuweisen.

Die Verwendung verschiedener Puffer zeigt nur Unterschiede in der Höhe der spez. Aktivitäten der untersuchten Fermente. Dabei sind bei Extraktionen mit Phosphatpuffer pH 7,6, 0,1 M ein wenig höhere Aktivitäten beobachtet worden als bei Extraktionen mit gleichmolarem Tris-(hydroxymethyelaminomethan)-HCl-Puffer. Wir extrahierten mit Tris-HCl-Puffer, da Phosphationen in einigen Fällen

Tabelle I

Vergleich zwischen den spez. Aktivitäten der Fermente bei Zellaufschluß im Homogenisator nach MERKENSCHLAGER und im Mörser mit Glaspulver bei Verwendung gleicher Algenmengen (Chlamydomonas eugametos)

	Homogenisator	Handaufschluß
Grad der Zertrümmerung	100%	ca. 60%
Proteingehalt der Extrakte	0,16 mg/ml	0,845 mg/ml
	µ Mol / mg Prot. x min	µ Mol / mg Prot. x min
A. Gesamthomogenat		
Aldolase	0,89	-
Zwischenferment	0,0004	-
6-PG-DH	0,001	-
B. Überstand		
Aldolase	0,36	0,0825
Zwischenferment	0,0	0,0152
6-PG-DH	0,0	0,0172
Transketolase	0,4	0,122
NAD-3-GAP-DH	1,24	0,235
NADP-3-GAP-DH	3,22	1,19
NADP-Glut.-DH	5,22	1,13
GOT	1,48	0,288

störend wirken können. Nach den Erfahrungen von KUHL (unveröffentlicht, vgl. auch BERGER, Diss. 1964) wird die Aldolase bei Chlorella pyrenoidosa mit Tris-HCl-Puffer nur zum Teil extrahiert. Dies wurde auch für Chlamydomonas eugametos festgestellt. Bei dichteren Kulturen ist dabei der Extraktionsgrad größer als in dünnen Anzuchten mit höherem Lichtgenuß der Zellen. Nach KUHL ist die Ausbeute bei der Extraktion umso größer, je höher der Phosphatgehalt der Zellen ist. Die Bestimmung der Aldolase erfolgte stets im Gesamthomogenat.

3. Bestimmungsmethoden

Das Trockengewicht ermittelten wir durch sechsstündiges Trocknen einer zweimal gewaschenen Algensuspension (2 - 10 ml je nach Kulturdichte) bei 105°C. Die Trockengewichtstiegel waren aus Aluminiumfolie hergestellt und nach KOWALLIK (1961) mit dest. Wasser vorbehandelt.

Der Gesamtstickstoff der Zellen wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Den Proteinstickstoff der Extrakte ermittelten wir nach Fällung mit 50%iger Trichloressigsäure (Endkonzentration 25%). Der Niederschlag wurde nach Zentrifugieren mit 5%iger Trichloressigsäure gewaschen. Um einen möglichst dickflockigen und damit leichter zentrifugierbaren Niederschlag zu erhalten, mußte sehr langsam gefällt werden. Nach ca. 30 min. bei Raumtemperatur stand die Fällung über Nacht im Kühlschrank.

Das Chlorophyll wurde mit 96%igem Methanol extrahiert und nach MACKINNEY (1941) (modifiziert nach BÖGER 1964) bei den Wellenlängen 665 und 650 nm photometriert.

4. Fermenttests (siehe Anhang)

III. Versuche und Ergebnisse

Organismen, die sowohl unter autotrophen Verhältnissen Photosynthese betreiben als auch in Abwesenheit von Licht unter alleiniger Ausnutzung organischer Kohlenstoffquellen wachsen können, werden nach PRINGSHEIM (1959) als amphitroph bezeichnet. Die Scala der verwertbaren Kohlenstoffverbindungen ist insgesamt sehr umfangreich. Jedoch kann deren Ausnutzung bei den verschiedenen Arten und Stämmen sehr stark differieren. Glukose wird z.B. von Chlorella (pyrenoidosa, luteoviridis, vulgaris) und Scenedesmus (Stamm D 3) aufgenommen und verarbeitet (NEISH, 1958, SAMEJIMA und MYERS, 1958); jedoch vermag von den genannten Arten nur Scenedesmus Mannose als Kohlenstoffquelle auszunutzen (SAMEJIMA und MYERS 1958). Erste Voraussetzung für eine Verarbeitung ist natürlich, daß die Plasmagrenzschicht für den betreffenden Stoff permeabel ist.

Unter den amphitrophen Algen wurden drei Arten ausgewählt, die sich im Verhalten ihres Photosyntheseapparates - beurteilt am Chlorophyll - gegenüber Glukosegabe unterschieden. Es war von besonderem Interesse, solche Unterschiede mit dem Verhalten der Fermentsysteme in Vergleich zu setzen.

1. Chlorella pyrenoidosa CHICK, Stamm 211-8b

Erfahrungen über die Anzucht von Chlorella mit Glukose als alleiniger oder zusätzlicher Kohlenstoffquelle (heterotroph oder mixotroph) liegen bereits vor (z.B. SAMEJIMA und MYERS 1958, NEISH 1951, BERGMANN 1955 an Chlorella vulgaris). Da es sich aber um ganz verschiedene Herkünfte handelt und bei Chlorella sehr große Unterschiede innerhalb der Arten nachgewiesen sind, war es erforderlich, die Wachstumsdaten des hier benutzten Stammes zunächst genau festzulegen.

a) Wachstum der Kulturen (Trockengewicht, Gesamt-N, Chlorophyll)

Die Trockengewichtszunahme der nach Erreichen der Standarddichte unter mixotrophe oder heterotrophe Bedingungen gebrachten bzw. autotroph belassenen Kulturen ist in Abb.1 dargestellt. Zugabe von Glukose fördert die Trockengewichtsproduktion sehr stark, wobei die Werte der mixotrophen Kultur zunächst noch höher als diejenigen der heterotrophen Anzucht liegen. Die Werte der mixotrophen Kultur übersteigen den durch Addition erhaltenen Betrag der autotrophen und heterotrophen Kulturen, so daß mit einer zusätzlichen Lichtwirkung gerechnet werden muß. Vergleicht man jedoch die Trockengewichtszunahme mit der Zunahme des Gesamt-Stickstoffs, so ergibt sich, daß die starke Trockengewichtszunahme in der mixotrophen Kultur in erster Linie einer erhöhten Kohlenhydratspeicherung zuzuschreiben ist. Von der 72.Stunde der Kultur muß mit Eintreten von N- und Glukosemangel gerechnet werden.

Der Chlorophyllgehalt der Kulturen nimmt in absolutem Maß unabhängig von der Ernährungsform zu.(Abb.1) Daraus ergibt sich natürlich, daß die auf den Gesamt-N bezogene Chlorophyllmenge in der mixotrophen und heterotrophen Kultur erheblich, d.h. etwa auf die Hälfte herabsinkt. Die N-Zunahme bei Zuckerfütterung, die im wesentlichen eine Vermehrung des Eiweißgehaltes (vgl. RUPPEL 1962) widerspiegelt, spielt sich also offensichtlich außerhalb der Chlorophyll führenden Strukturen ab, d.h. im Cytoplasma und vielleicht auch im Plastidenstroma. Die anfängliche Zunahme des N-bezogenen Chlorophylls in der autotrophen Kultur ist eine Folge der während des Wachstums eintretenden Verringerung des Lichtgenusses der Zellen (vgl. DERSCH 1960, BÖGER 1964).

Die Bestimmung der Zellzahl ist bei Chlorella pyrenoidosa Stamm 211-8b unter den hier gegebenen Bedingungen als vergleichendes Wachstumsmaß nicht geeignet. Zwar ist die

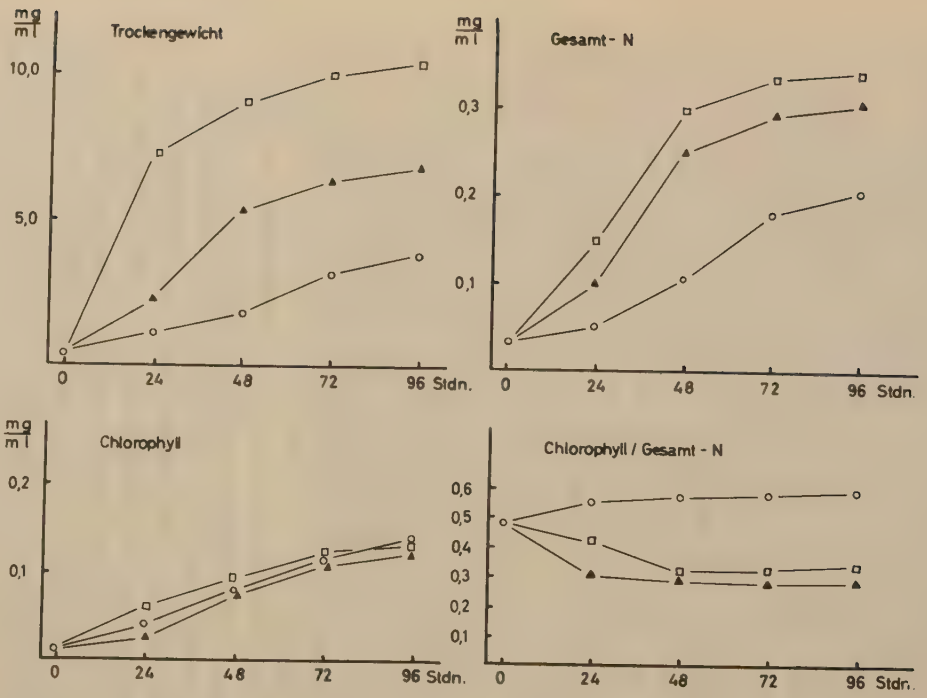

Abb. 1 Anzuchtdaten von Chlorella pyrenoidosa unter autotrophen O—O, mixotrophen □—□ und heterotrophen ▲—▲ Ernährungsbedingungen. Glukosegabe zum Zeitpunkt 0.

Produktion von Tochterzellen in der mixotrophen Kultur gegenüber der autotrophen Anzucht gefördert, in der heterotrophen Dunkelkultur jedoch wird die Zellteilung durch den Glukosezusatz trotz Fortgangs der Protein- und Chlorophyllsynthese stark verzögert (vgl. SENGER 1962). Die zur Zeit des Verdunkelns noch teilungsfähigen Zellen setzen innerhalb der nächsten 24 Stunden ihre Autosporen frei; alle übrigen Zellen vergrößern ihr Volumen erheblich (Zelldurchmesser von 40 bis 50 µ). Die erste Teilung dieser Zellen erfolgt zwischen der 60. und 72.Stunde nach Verdunkeln und Glukosegabe.

b) Spezifische Fermentaktivitäten

Die spez. Aktivitäten der untersuchten Fermente unterliegen beim Übergang aus der autotrophen Kultur zur mixotrophen oder gar heterotrophen Ernährung z.T. erheblichen Änderungen. Eine starke Erhöhung der spez. Aktivität des Zwischenfermentes, als des Schlüsselenzyms des Pentosephosphatcyclus, ist bereits 12 Stunden nach Glukosegabe eingetreten. Aktivitätszunahmen waren nach etwa 24-stündiger Glukosekultur auch bei der Hexokinase und der Phosphoglucomutase, also den Fermenten, die wie das Zwischenferment den Pentosephosphat-Cyclus einleiten, zu beobachten. (Abb.2) Eine kurze Mitteilung über die Aktivierung von Zwischenferment und 6-PG-DH in heterotrophen Chlorella-Kulturen mit Glukose als Kohlenstoffquelle machten auch DEVLIN und RAYMOND (1963). Andererseits waren die Fermente NAD- und NADP-abhängige Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase sowie GOT (Abb.3), letzteres Ferment jedoch weniger ausgeprägt, nach Glukosegabe mit verminderter spez. Aktivität nachzuweisen. Die Glutamat-Dehydrogenase (Abb.4) erfährt nach Glukosegabe im Licht eine starke Zunahme der spez. Aktivität. Im Dunkeln bleibt sie dagegen hinter der allgemeinen Proteinsynthese zurück. Mit der 48.Stunde nach Glukosegabe sind die Veränderungen im

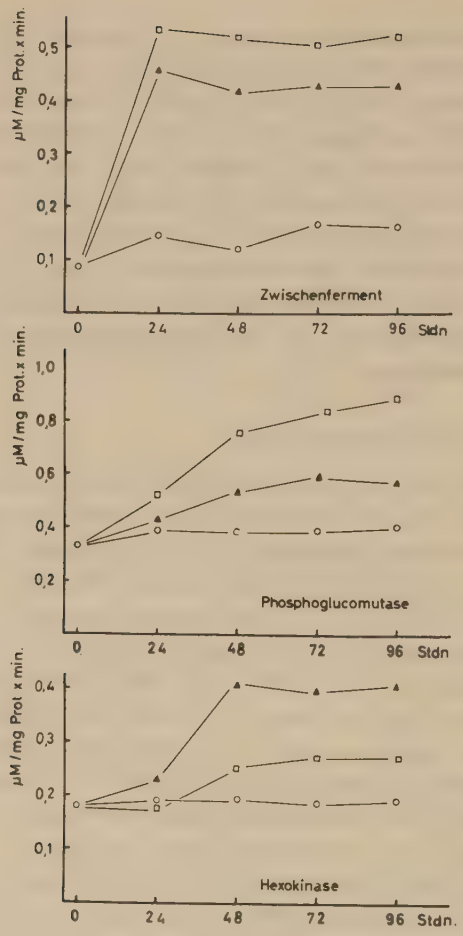

Abb.2 Chlorella pyrenoidosa; spez. Aktivitäten (µ Mol pro mg Extraktprotein x 1 Minute) von Zwischenferment, Phoephoglucomutase und Hexokinase beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

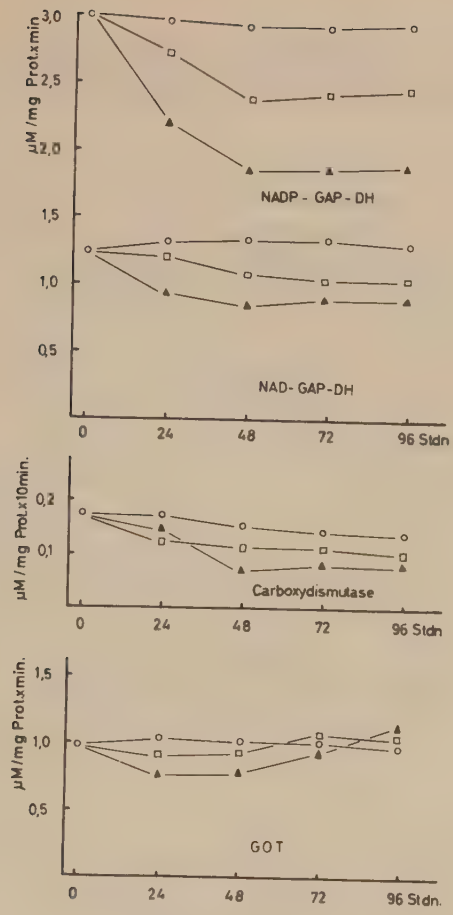

Abb.3 Chlorella pyrenoidosa; spez. Aktivitäten von NADP-GAP-DH, NAD-GAP-DH, Carboxydismutase und GOT beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

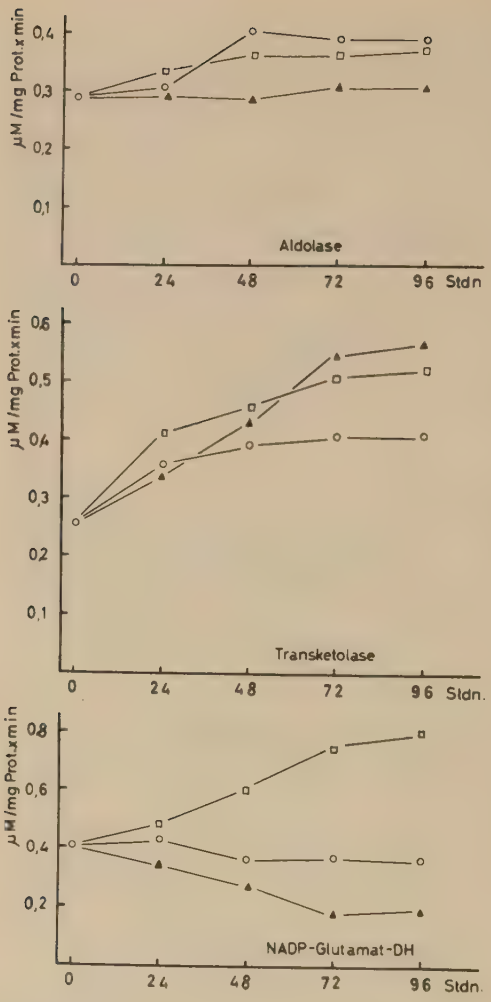

Abb.4 Chlorella pyrenoidosa; spez. Aktivitäten von Aldolase, Transketolase und NADP-Glutamat-DH beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

wesentlichen abgeschlossen. Im gleichen Zeitraum waren in der autotrophen Kultur keine größeren Unterschiede zu erkennen.

Daß im Falle der Abnahme der spez. Aktivität die Fermentproduktion nicht stillgelegt ist, zeigen die Kurven für die Aktivitäten in Abhängigkeit von der Volumeneinheit (ml) der wachsenden Kulturen für den Fall der NADP-GAP-DH. (Abb.5) Es handelt sich offenbar bei der Verringerung der spez. Aktivität um die Folge einer gegenüber der Gesamtproteinsynthese bzw. gegenüber anderen Fermenten (z.B. Zwischenferment) verminderten Neuproduktion.

Um die Möglichkeit eines Einflusses der während des Wachstums zunehmenden Zelldichte und des damit veränderten Lichtgenusses der Zellen zu prüfen und evtl. auszuschalten, wurden Versuche an Kulturen vorgenommen, die bei einer annähernd konstanten Zelldichte gehalten wurden ($\Delta E = 0,2 - 0,25$, bei 1014 nm am Eppendorfphotometer gemessen), und zwar durch Verdünnung mit frischer Nährlösung im Abstand von ca. 2 Stunden. In keinem Fall ergaben sich nach dieser Maßnahme wesentliche Änderungen im Verlauf der spez. Aktivitäten; auf eine Darstellung von Einzeldaten kann daher verzichtet werden.

Aus rein quantitativen Gründen ist nicht zu erwarten, daß sich der Zunahme der spez. Aktivität einiger weniger Fermente eine entsprechende Abnahme für Aktivitäten anderer Fermente ergeben muß. Nur dann, wenn im Zuge einer tiefgreifenden Umstellung der Ernährungsform größere Protein- oder Fermentkomplexe (z.B. Chloroplastenprotein und Cytoplasmaproteine) innerhalb der Gesamteiweißsynthese in Konkurrenz treten, kann man gegenläufige Änderungen der spez. Aktivitäten mit einiger Sicherheit erwarten.

c) Fermentaktivitäten in Beziehung zum Chlorophyllgehalt

Eine Beziehung zwischen Fermentaktivitäten und Chlorophyllgehalt einer Zelle liegt besonders bei den Fermenten nahe,

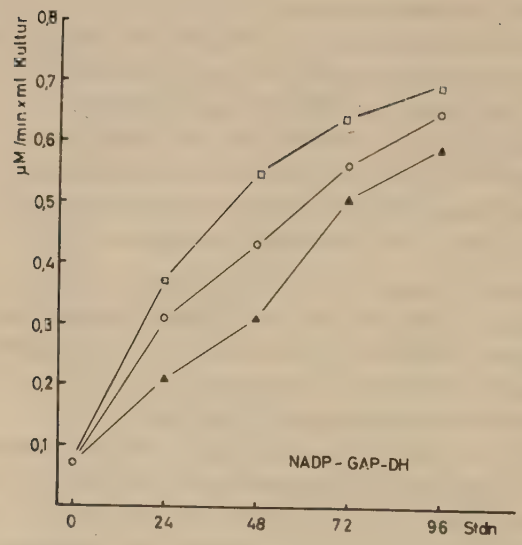

Abb.5 Chlorella pyrenoidosa; Aktivität (µ Mol Substratumsatz pro 1 Minute) der NADP-GAP-DH bezogen auf 1 ml Kultursuspension beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

die nach vorliegenden Erfahrungen vollständig im Chloroplasten lokalisiert sind. Dies gilt z.B. für die NADP-GAP-DH (vgl. z.B. SMILLIE 1963). Wenn auch der Chlorophyllgehalt der Chloroplasten gewissen Schwankungen unterliegen kann (BÖGER 1964), so kann doch beim Übergang von der autotrophen Ernährung zur mixotrophen oder gar zur heterotrophen Ernährung der Chlorophyllgehalt der Zellen in erster Näherung als ein Maß für den Anteil des photosynthetisch aktiven Chloroplastenmaterials an der gesamten Zellsubstanz dienen.

Wenn innerhalb des Photosyntheseapparats eine feste Beziehung zwischen Chlorophyll und Photosynthesefermenten besteht, so müßten Änderungen im Chlorophyllgehalt mit den entsprechenden Unterschieden der spez. Fermentaktivität einhergehen. Da aus methodischen Gründen eine direkte Bezugnahme der Fermentaktivität einer Zelle auf ihren Chlorophyllgehalt nicht möglich ist, haben wir den Quotienten zwischen der spez. Aktivität und dem Chlorophyllgehalt pro Gesamt-N gebildet. Dies ist zulässig, solange das Verhältnis Gesamtstickstoff zu pufferextrahiertem Stickstoff unverändert bleibt. Man erhält so bei der NADP-GAP-DH unabhängig von der Ernährungsform gleiche Werte, obwohl der Chlorophyllgehalt pro Gesamt-N in der mixotrophen und heterotrophen Kultur erheblich abnimmt. (vgl. Abb.6) Dies spricht dafür, daß das Ferment recht genau entsprechend der Verminderung der photosynthetisch wirksamen Chloroplastensubstanz reduziert wird. Das Zwischenferment nimmt umgekehrt bei entsprechender Bezugnahme in der heterotrophen und mixotrophen Kultur sehr stark zu. Damit kommt zum Ausdruck, daß dieses Ferment mit dem Nichtplastidenanteil der Zelle vermehrt wird. Für die Carboxydismutase läßt sich eine Bindung an den Chloroplastenanteil auf diesem Wege nicht mit Sicherheit belegen, wenn sich auch die betreffenden Daten für die autotrophe und die heterotrophe Kultur kaum unterscheiden.

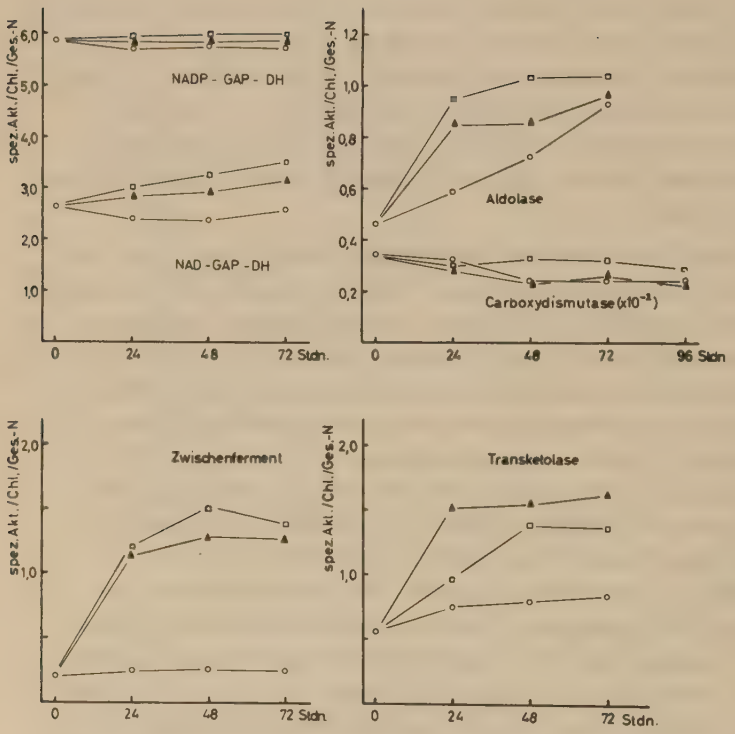

Abb.6 Chlorella pyrenoidosa; spez. Aktivität (/u Mol Substratumsatz pro mg Extraktprotein x 1 Minute) einiger Fermente bei Bezugnahme auf das Verhältnis Chlorophyll zu Gesamt-N während des Überganges aus autotropher zu mixotropher und heterotropher Kultur.
Zeichen wie in Abb.1

Transketolase und Aldolase sowie NAD-GAP-DH zeigen eine mäßige bis geringe Zunahme bei heterotropher und mixotropher Kultur gegenüber der autotrophen Vergleichskultur. (Abb.6) Diese Effekte lassen sich insofern schwer auswerten, als diese Fermente innerhalb und außerhalb der Plastiden vorkommen und ihre Abnahme im Plastiden von einer Zunahme im Plasma begleitet sein dürfte (vgl. SMILLIE 1963). Nach den vorliegenden Daten kann man vermuten, daß die Zunahme außerhalb der Plastiden die Abnahme innerhalb der Plastiden überkompensiert.

Eine Übersicht über die Änderungen der Fermentaktivitäten beim Übergang aus der autotrophen Kultur zur Glukoseernährung ist im Säulendiagramm (Abb.7) dargestellt. Die spez. Fermentaktivitäten der mit Glukose ernährten Zellen sind in Prozent der Aktivitäten der Zellen unter autotrophen Bedingungen aufgetragen. Als Zeitpunkt für die Kolumnenwerte wurde die 48.Stunde nach Glukosezugabe gewählt. Es lassen sich in erster Linie zwei Gruppen von Fermenten unterscheiden. In der einen sind die Fermente zusammengefaßt, deren spez. Aktivitäten in den Zuckerkulturen gegenüber der autotrophen Kultur erhöht sind. Es sind das das Zwischenferment, die Hexokinase, die Phosphoglucomutase und in geringerem Maße die Transketolase. Die andere Gruppe mit Fermenten mit niedrigerer spez. Aktivität in den Glukosekulturen umfaßt die photosynthetischen Fermente, NADP-GAP-DH und Carboxydismutase, die Fermente der Glycolyse, NAD-GAP-DH und mit Einschränkung die Aldolase sowie die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Eine Sonderstellung liegt bei der NADP-Glutamat-DH vor, mit einer erhöhten spez. Aktivität in der mixotrophen und einer erniedrigten in der heterotrophen Kultur.

d) Glukosewirkung nach Vorverdunklung

Hält man autotroph angezogene Kulturen längere Zeit im Dunkeln, so werden die von den Zellen im Licht synthet

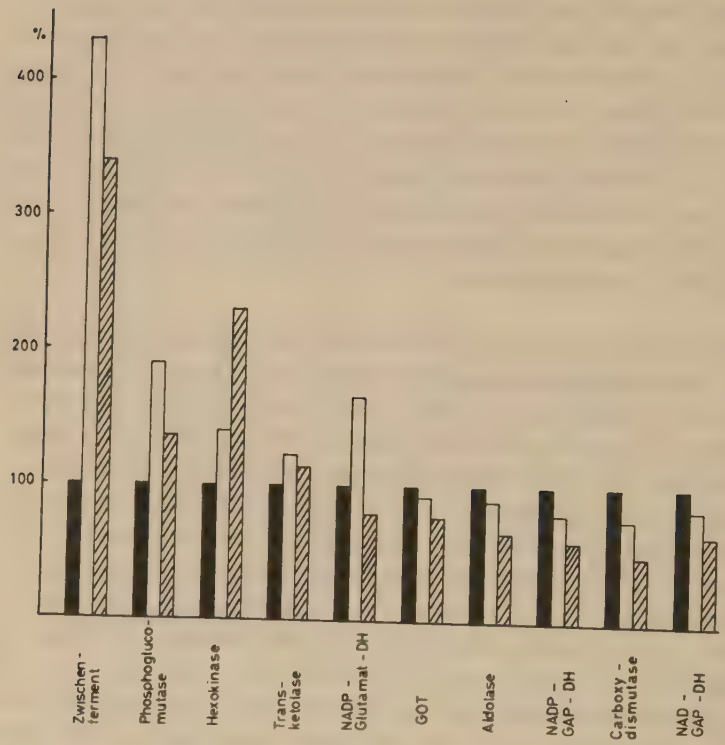

Abb.7 Chlorella pyrenoidosa; Fermentaktivitäten in der 48. Stunde nach Glukosegabe zu einer autotroph angezogenen Kultur.
Darstellung der spez. Aktivitäten (/u Mol Substratumsatz pro 1 Minute x mg Extraktprotein) der untersuchten Fermente im Vergleich zur Aktivität in der autotrophen Kultur.
autotrophe Kultur = 100%

autotrophe Anzucht
mixotrophe Anzucht
heterotrophe Anzucht

sierten Reservestoffe weitgehend aufgebraucht. Die Zellen sind schließlich nicht mehr in der Lage, Synthesen auszuführen, da ihnen eine zusätzliche Energiequelle fehlt. Gibt man einer auf diese Weise 4 Tage ausgehungerten Kultur Glukose, wird diese sofort von den Algen aufgenommen. Nach 8 - 10 Stunden hat sich das Trockengewicht der Kultur etwa verdoppelt. (Abb.8) Die Gesamt-N-Zunahme bleibt bis etwa 24 Stunden hinter der Trockengewichtszunahme zurück. Die Chlorophyllsynthese ist in diesen Kulturen zunächst unterdrückt. Erst von der 60. Stunde an beginnt eine meßbare Neubildung des Pigmentes. Die Zellteilung setzt nach einer 4-tägigen Vorkultur im Dunkeln 96 - 120 Stunden nach Glukosegabe ein. Verlängert man die Vorkultur, so verschiebt sich der Zeitpunkt der Autosporenfreisetzung.

In den verdunkelten, autotroph angezogenen Zellen ändern sich die spez. Fermentaktivitäten der meisten der untersuchten Fermente nicht oder nur sehr wenig. Ein Übergang zum heterotrophen Typ der Fermentzusammensetzung wird also von den zunächst noch gespeicherten Kohlenhydratreserven nicht in Gang gebracht. Lediglich die NADP-Glutamat-DH verliert ihre Aktivität. HILLER und WHITTINGHAM (1964) beobachteten bei Darbietung von $^{14}CO_2$ im Dunkeln keine Markierung im Glutamat bei Chlorella pyrenoidosa. Bei Zugabe radioaktiver Glukose im Dunkeln fanden sie andererseits eine starke Markierung in Glutaminsäure, Alanin und Asparaginsäure. Das stimmt mit unseren Erfahrungen insofern überein, als nach Zusatz von Glukose zwar eine geringe, aber eindeutige Zunahme der spez. Aktivität der Glutamat-DH stattfand.(Abb.9) Gleiches konnte für das Zwischenferment (vierfache Zunahme), die Phosphoglucomutase (Verdopplung in 72 Stunden) und die Hexokinase (Verdopplung in 72 Stunden) gezeigt werden. Die Erhöhung der spez. Aktivität setzt in der 4. - 6. Stunde nach Zuckergabe ein. In dieser Zeit beginnt auch der Gesamt-N der Zellen zuzunehmen. Die Fermentaktivierung ist also offenbar an die Neusynthese von Protein gebunden.

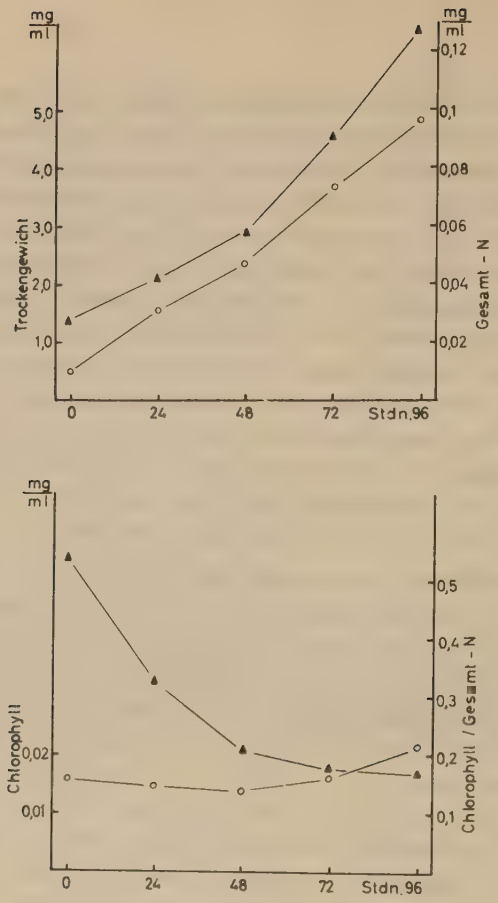

Abb.8 Chlorella pyrenoidosa; Anzuchtdaten nach Glukosegabe zu einer autotroph angezogenen und 4 Tage vorverdunkelten Kultur.
Glukosegabe zum Zeitpunkt 0

oben: ○——○ Trockengewicht
▲——▲ Gesamt-N
unten: ○——○ Chlorophyll
▲——▲ Chlorophyll/Gesamt-N

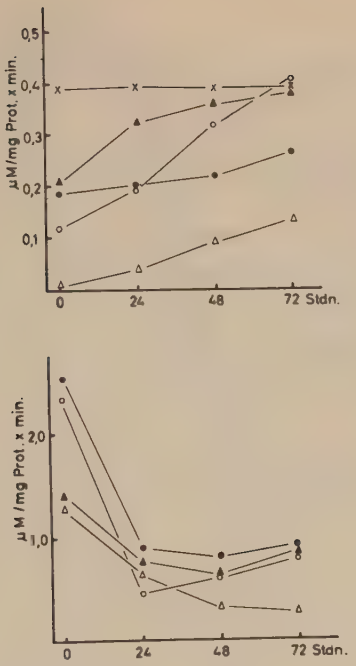

Abb.9 Chlorella pyrenoidosa; Veränderungen der spez. Aktivitäten einiger Fermente nach Glukosegabe zu einer autotroph angezogenen und 4 Tage vorverdunkelten Kultur.

oben: △——△ Glutamat DH
× —— × Aldolase
○ —— ○ Zwischenferment
● —— ● Transketolase
▲ ——▲ Phosphoglucomutase

unten: ○—◎ Carboxydismutase
● — ● NADP-GAP-DH
△—△ NAD-GAP-DH
▲—▲ GOT

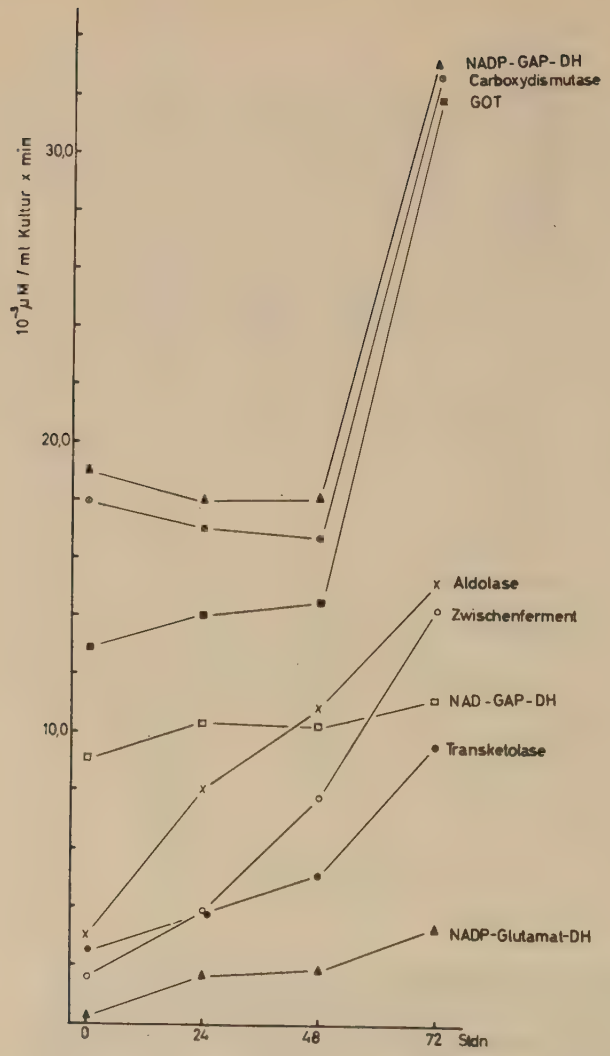

Abb.10 Chlorella pyrenoidosa; Versuch wie in Abb.8 und 9. Fermentaktivitäten (µ Mol Substratumsatz pro 1 Minute) bezogen auf ml Kultursuspension.

Den genannten Fermenten stehen die Aldolase, die Carboxydismutase, die NADP- und NAD-GAP-DH und die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase gegenüber. Nach Glukosegabe bleibt die Aktivität der Aldolase weiterhin annähernd unverändert, während die spez. Aktivität der anderen genannten Fermente zurückgeht. Dabei ist die Abnahme der NADP-GAP-DH und der Carboxydismutase ausgeprägter als die der NAD-GAP-DH.

Um die Aktivitäten der Fermente in den wachsenden Zellen unabhängig von den Veränderungen des Gesamt-N Gehaltes zu Verfolgen, wurden die Substratumsätze pro Testansatz auf die Kulturvolumina bezogen. Die erhaltenen Werte (Abb.10) spiegeln das unterschiedliche Verhalten der Fermente während des Zellwachstums wider; die ersten Zellteilungen treten unter den gegebenen Versuchsbedingungen 120 Stunden nach Glukosegabe ein. Zwischenferment, Transketolase, Glutamat-DH und Aldolase werden vom Zeitpunkt der Glukosegabe an (s.o.) vermehrt. Überraschend ist, daß die NAD-GAP-DH als ein Ferment der Glycolyse in der Versuchszeit sehr schwach vermehrt wird. NADP-GAP-DH, Carboxydismutase und GOT bleiben bis zur 48. Stunde nach Glukosegabe in unveränderter Menge in den Zellen vorhanden. Danach setzt eine deutliche Zunahme dieser Fermente ein, die ungefähr einer Neubildung von Chlorophyll im Dunkeln entspricht. Dies legt die Annahme nahe,daß die Bildung der Chloroplasten und ihrer Fermentgarnitur bei vorverdunkelten Chlorella pyrenoidosa (Stamm 211-8b) nach Glukosegabe gegenüber extraplastidären Fermenten stark verzögert ist. Es sei unter Hinweis auf Abb.3 betont, daß diese zeitliche Trennung im Verhalten der Fermente bei unmittelbarem Übergang von autotrophen zu heterotrophen Bedingungen nicht beobachtet wird.

2. Chlorella luteoviridis CHODAT, Stamm 211-2b

a) Wachstum der Kulturen

Chlorella luteoviridis ist ernährungsphysiologisch dadurch charakterisiert, daß sie autotroph und heterotroph (Glukose) relativ langsam, aber gleich stark wächst; bei mixotropher Ernährung ist das Wachstum stark gefördert. Anders wie bei Chlorella pyrenoidosa wird das Chlorophyll bei Glukosegabe im Licht und im Dunkeln im Wachstumsverlauf stark zurückgedrängt; eine geringe Neusynthese von Chlorophyll ist jedoch noch möglich. Diese Verhältnisse werden durch Abb.11 näher erläutert.

Innerhalb der ersten 24 Stunden steigen Trockengewicht und Gesamt-N in der mixotrophen Kultur auf das 4-5-fache an. Dagegen erreichen die autotroph belassene und die heterotrophe Kultur nur das 3-fache.

Der Chlorophyllgehalt nimmt in der autotrophen Kultur in viel stärkerem Maße zu als das Trockengewicht und der Gesamt-N. Der Quotient Chlorophyll/Gesamt-N steigt innerhalb von 120 Stunden auf das Dreifache. Der Unterschied im Chlorophyllgehalt der "Starklichtzellen" und "Schattenzellen" ist bei Chlorella luteoviridis sehr viel ausgeprägter als bei Chlorella pyrenoidosa. Dies ist eine Folge des während des Wachstums der Kultur absinkenden Lichtgenusses der Zellen.

b) Spezifische Fermentaktivitäten

In den Abb.12-14 sind die auf Protein bezogenen Aktivitätsänderungen der untersuchten Fermente im Verlauf des Wachstums der drei Kulturtypen dargestellt. Es fällt zunächst im Vergleich zu Chlorella pyrenoidosa auf, daß einige Fermente in der autotroph belassenen Kultur während des Wachstums derselben ihre spez. Aktivitäten mehr oder weniger stark erhöhen. An diesem Effekt sind die Fermente NADP-GAP-DH, Carboxydismutase, Aldolase und Transketolase

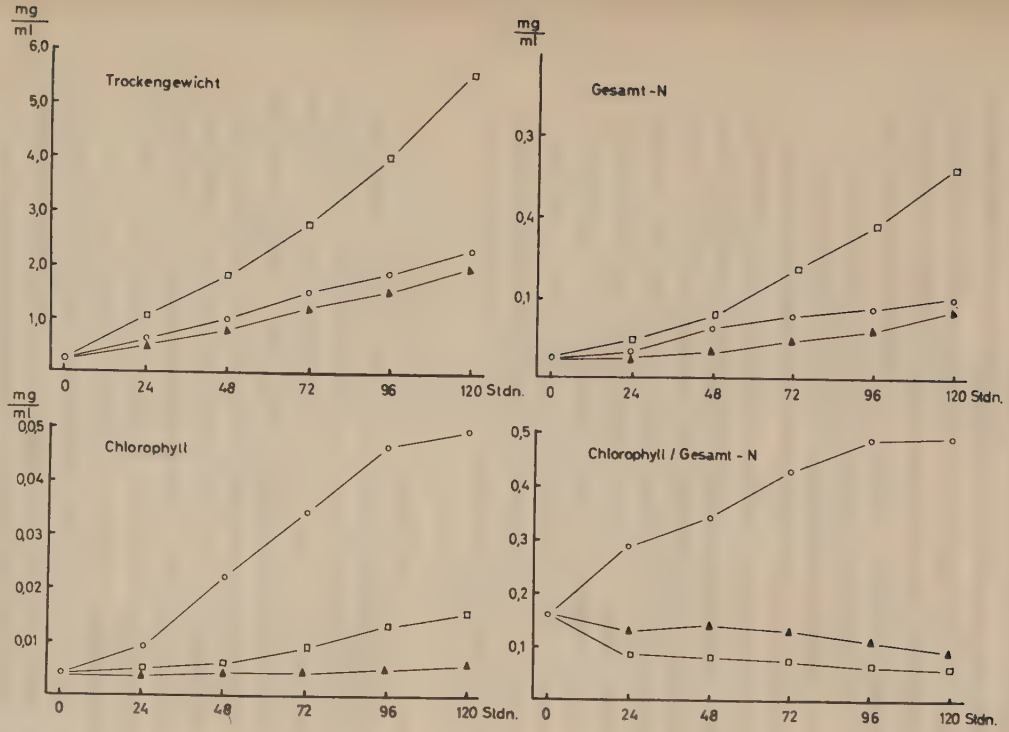

Abb. 11 Anzuchtdaten von Chlorella luteoviridis unter autotrophen, mixotrophen und heterotrophen Ernährungsbedingungen. Zeichen wie in Abb. 1

in absteigender Reihenfolge beteiligt. Diese Fermente gehören ganz oder teilweise dem Chloroplasten bzw. dem Photosynthesemechanismus an. Wie bereits erwähnt nimmt auch der Chlorophyllgehalt in der dichter werdenden autotrophen Kultur bei Bezugnahme auf den Gesamt-N Gehalt erheblich zu. Während beim Übergang von autotropher Ernährung zur Zuckerernährung (mixotroph oder heterotroph) im allgemeinen der Zunahme der spez. Aktivitäten einiger Fermente eine Abnahme derjenigen anderer Fermente entspricht, ist die Aktivitätszunahme im Wachstumsverlauf der autotroph gehaltenen Kultur nicht von einer solchen gegenläufigen Aktivitätsabnahme begleitet. Die Erklärung hierfür kann man darin suchen, daß es sich nicht um die Umschaltung der Synthese eines Fermentsystems auf Kosten eines anderen, sondern um eine begrenzte Zusatzbildung der mit dem Chlorophyll im Chloroplasten lokalisierten Fermente handelt; der Proteinanteil derselben, der mit dem Chlorophyll bei abnehmendem Lichtgenuß der Zellen vermehrt wird, braucht sich auf die Proteinsynthese insgesamt nicht weiter auszuwirken.

Zwischenferment und Hexokinase (Abb.12) nehmen wie bei Chlorella pyrenoidosa beim Übergang zur Zuckerernährung im Licht und im Dunkeln stark zu. Bemerkenswert ist, daß im vorliegenden Falle auch die NAD-GAP-DH (Abb.13) gefördert ist. Gleichzeitig erleiden die spez. Aktivitäten der Fermente Carboxydismutase und NADP-GAP-DH einen Abfall. (Abb.13) Besonders in der mixotrophen Kultur nimmt die spez. Aktivität bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Glukosegabe auf etwa die Hälfte ab. Daß der Abfall in der heterotrophen Kultur langsamer vonstatten geht, läßt sich zwanglos mit dem geringeren Wachstum derselben erklären; innerhalb der Konkurrenz der Fermentkomplexe sind daher Carboxydismutase und NADP-GAP-DH nicht so stark benachteiligt wie in den sehr wüchsigen mixotrophen Anzuchten.

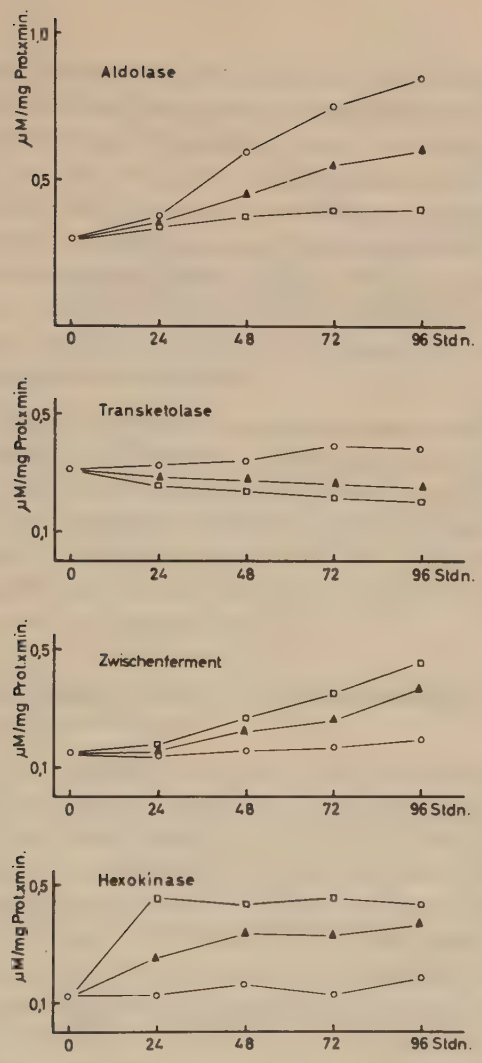

Abb.12 Chlorella luteoviridis; spez. Aktivitäten von Aldolase, Transketolase, Zwischenferment und Hexokinase beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung. Zeichen wie in Abb.1

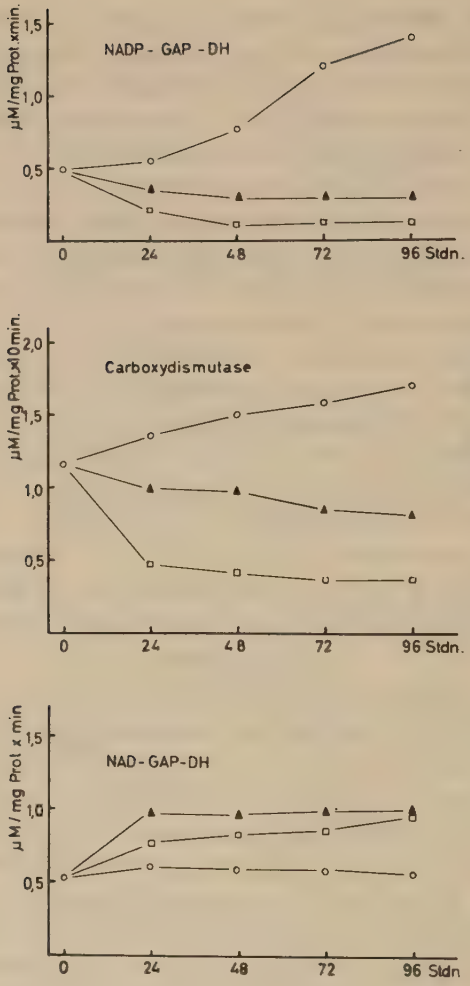

Abb. 13 Chlorella luteoviridis; spez. Aktivitäten von NADP-GAP-DH, Carboxydismutase und NAD-GAP-DH beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

Die spez. Aktivität der GOT zeigt in der autotrophen und heterotrophen Kultur nur geringe Unterschiede.(Abb.14) Aus dem gleichartigen Wachstum beider Kulturen und dem parallelen Verlauf der spez. Aktivitäten des Fermente in autotropher und heterotropher Anzucht kann auf eine Unabhängigkeit der GOT von der Ernährungsform geschlossen werden. Die niedrigere Aktivität in der mixotrophen Kultur ist auch hier offenbar auf eine Benachteiligung der Synthese dieses Fermentes gegenüber anderen, bevorzugt gebildeten Eiweißen zurückzuführen.

In beiden Glukosekulturen (mixotroph und heterotroph) nimmt die spez. Aktivität der Glutamat-DH ab. Eine mögliche Beziehung zum Chloroplasten - der Chlorophyllgehalt geht in beiden Kulturen ebenfalls zurück - konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. In der autotrophen Anzucht unterliegt die spez. Aktivität der Glutamat-DH keinen Veränderungen.

c) Beziehungen zwischen dem Chlorophyllgehalt und den Fermentaktivitäten

Eine direkte Bezugnahme der spez. Fermentaktivitäten auf den Chlorophyllgehalt der Zellen ist, wie bereits bei der Besprechung von Chlorella pyrenoidosa dargelegt wurde, nicht möglich. Aus der annähernden Übereinstimmung im Verlauf des Chlorophyll/Gesamt-N Verhältnisses (Abb.11) und demjenigen der spez. Aktivität der Fermente des Photosynthesecyclus (NADP-GAP-DH und Carboxydismutase, Abb.13) in wachsenden Kulturen läßt sich bereits eine Beziehung herauslesen. Dies ist am Beispiel der NADP-GAP-DH in Abb.15 genauer dargestellt. Für die autotrophe Kultur erhält man während der gesamten Kulturdauer konstante Werte. Das spricht dafür, daß mit der Zunahme des photosynthetischen Chloroplastenmaterials (gemessen am Pigmentgehalt) unter autotrophen Bedingungen eine entsprechende Vermehrung der NADP-GAP-DH stattfindet. In beiden Glukose-

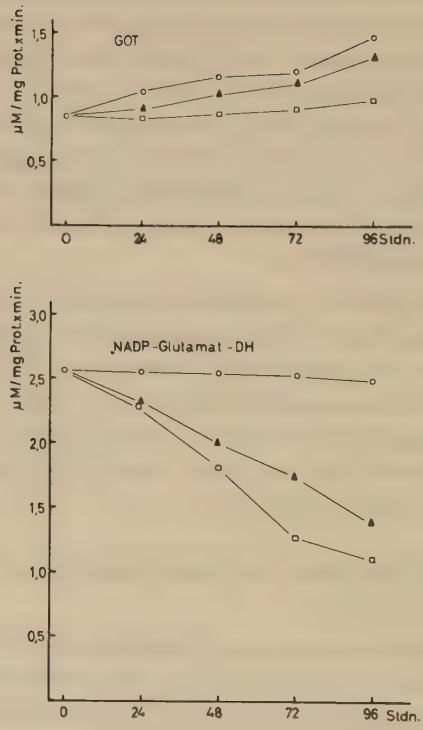

Abb.14 Chlorella luteoviridis; spez. Aktivitäten von GOT und Glutamat-DH beim Übergang von autotropher zu mixotropher und heterotropher Ernährung.
Zeichen wie in Abb.1

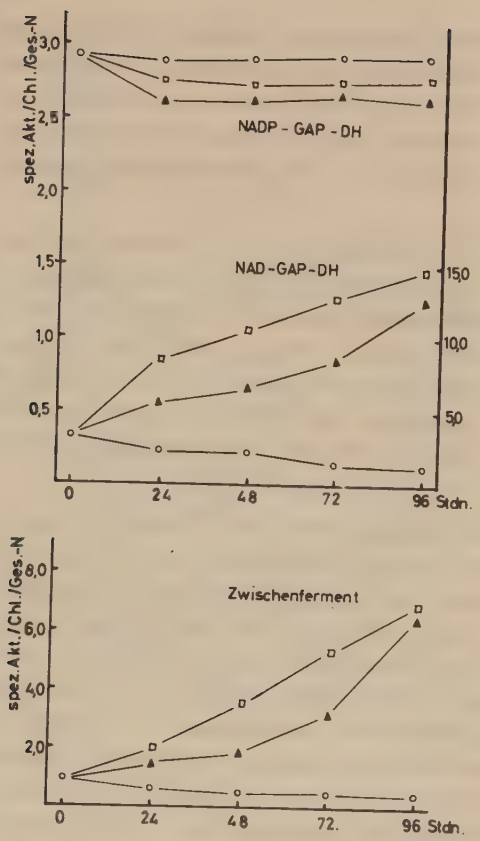

Abb.15 Chlorella luteoviridis; spez. Aktivitäten (/u Mol Substratumsatz pro 1 Minute x mg Extraktprotein) von NADP-GAP-DH, NAD-GAP-DH und Zwischenferment bei Bezugnahme auf das Verhältnis Chlorophyll zu Gesamt-N während des Überganges aus autotropher zu mixotropher und heterotropher Kultur.
Zeichen wie in Abb.1

kulturen ist diese Beziehung ebenfalls nachgewiesen. Die niedrigeren Werte gegenüber denen der autotrophen Kultur können durch einen vermehrten Gehalt an extrahierbarem Protein hervorgerufen sein, sofern das Verhältnis cytoplasmatischen Proteins zu Plastidenprotein wesentlich erhöht ist.

Von den Fermenten außerhalb der Plastiden nehmen umgekehrt bei einer Bezugnahme auf das Chlorophyll/Gesamt-N Verhältnis das Zwischenferment und die NAD-GAP-DH (Abb.15) in den Glukosekulturen stark zu. Ähnliche Ergebnisse erhält man für die Aldolase sowie für die Transketolase (Abb.16); in letzterem Falle ist der Anstieg weniger ausgeprägt. Hier muß man wieder mit gegenläufigen Änderungen im Plastiden und im Cytoplasma rechnen.

Abb.17 gibt zusammenfassend eine Übersicht über die Veränderungen der Fermentaktivitäten in den drei Kulturtypen. Dargestellt sind gemittelte Werte der 48. Stunde nach Glukosegabe. Es können also wie bei Chlorella pyrenoidosa hinsichtlich des Verhaltens nach Glukosegabe zwei Gruppen von Fermenten unterschieden werden. Die einen liegen in den Glukosekulturen mit niedrigerer Aktivität vor; ihr gehören die NADP-GAP-DH und die Carboxydismutase als Chloroplastenfermente sowie die Glutamat-DH, die GOT, die Transketolase und die Aldolase an. In die andere Gruppe fallen die NAD-GAP-DH, das Zwischenferment und die Hexokinase, die gegenüber der autotrophen Kultur höhere Aktivitäten aufweisen. Im Unterschied zu Chlorella pyrenoidosa ist die NAD-GAP-DH bei Glukosegabe deutlich erhöht; die Aktivitätserniedrigung von Carboxydismutase und NADP-GAP-DH ist vergleichsweise stärker ausgeprägt.

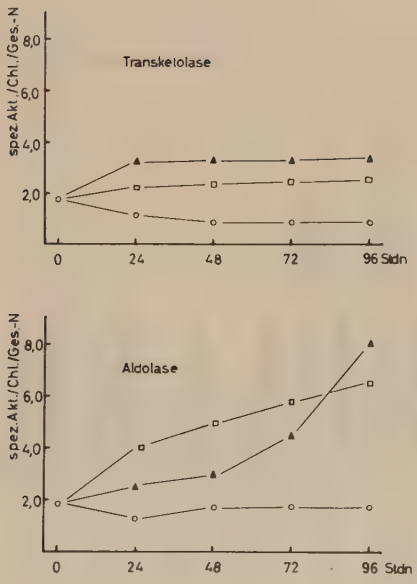

Abb.16 Chlorella luteoviridis; spez. Aktivitäten (/u Mol Substratumsatz pro 1 Minute x mg Extraktprotein) von Transketolase und Aldolase bei Bezugnahme auf das Verhältnis Chlorophyll zu Gesamt-N während des Überganges aus autotropher zu mixotropher und heterotropher Kultur.
Zeichen wie in Abb.1

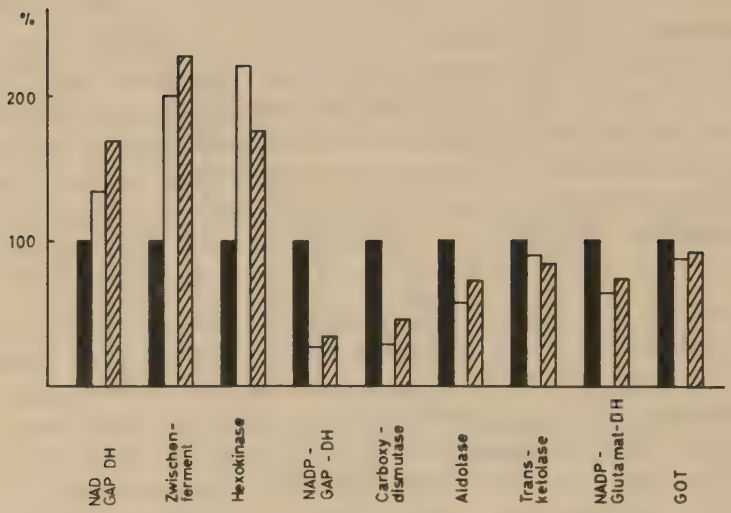

Abb.17 Chlorella luteoviridis; Fermentaktivitäten in der 48. Stunde nach Glukosegabe zu einer autotroph gezogenen Kultur.
Darstellung der Aktivitäten der untersuchten Fermente im Vergleich zur Aktivität in der autotrophen Kultur.
autotrophe Kultur = 100%

autotrophe Kultur
mixotrophe Kultur
heterotrophe Kultur

3. Euglena gracilis var. bacillaris PRINGSHEIM, Stamm P Nr. 1224-5/15

a) Wachstum der Kulturen

Während die zuvor behandelten Chlorella-Kulturen durch die höchste Produktivitätsrate in der mixotrophen Anzucht charakterisiert waren, wird dies bei Euglena gracilis nicht beobachtet, solange Glukose als organisches Material geboten wird. Die Wachstumskurven (Abb. 18), dargestellt am Trockengewicht und am Gesamt-N-Gehalt der Zellen, lassen nur geringe Unterschiede zwischen der autotroph verbliebenen und der mixotroph weitergezogenen Kultur erkennen. Die heterotrophe Glukosekultur wächst demgegenüber mit einer geringeren Zuwachsrate.

Der Chlorophyllgehalt pro Gesamt-N nimmt etwa entsprechend der zunehmenden Dichte der Zellen in der autotrophen und mixotrophen Kultur um etwa 50% zu. Damit ist ein deutlicher Unterschied zu Chlorella luteoviridis gegeben, bei der unter Einfluß der Glukose auch im Licht die Chlorophyllsynthese unterdrückt ist. Unter heterotrophen Bedingungen ist Euglena gracilis unfähig zur Pigmentproduktion. Diese schon lange bekannte Tatsache ist kürzlich durch elektronenoptische Untersuchungen der Plastidenstrukturen ergänzt worden (BEN SHAUL et al. 1965). Es zeigte sich, daß beim Übergang zur heterotrophen Dunkelkultur die lamelläre Struktur der Plastiden zunehmend verlorengeht. Nach 144 Stunden liegen nur noch "Proplastiden" in den Zellen vor.

b) Fermentaktivitäten

Das gleichartige Verhalten der autotrophen und mixotrophen Kulturen bei Euglena gracilis äußert sich auch im Verhalten der spez. Fermentaktivitäten. NADP-GAP-DH und Carboxydismutase zeigen in beiden Lichtkulturen einen parallelen Anstieg. (Abb. 19) Diese Zunahme kann auf den wachsenden Anteil der Chloroplasten an der Zelle (gemessen am Ver-

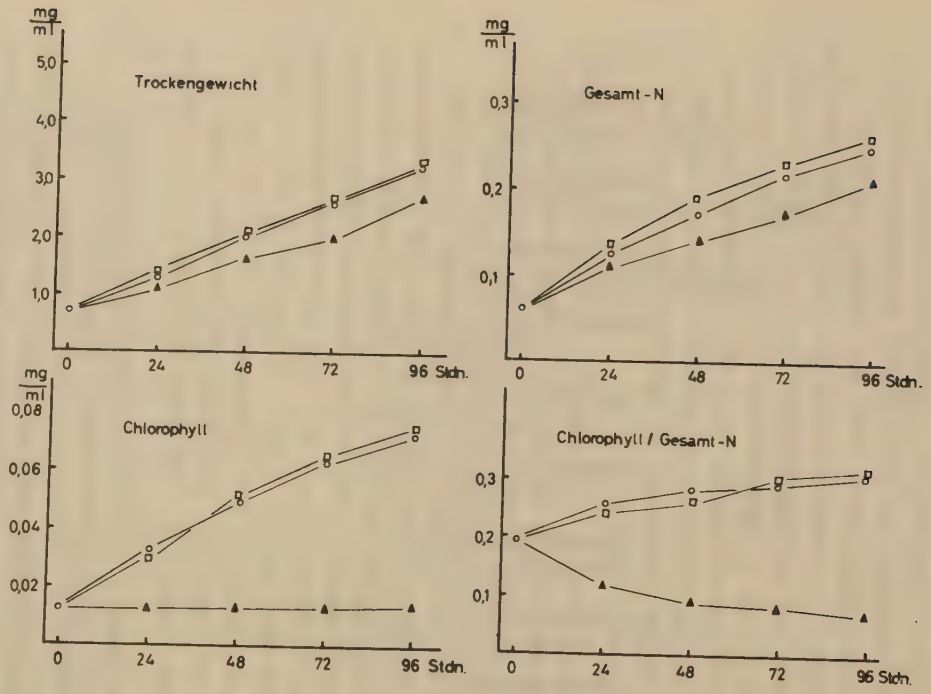

Abb. 18 Anzuchtdaten von Euglena gracilis unter autotrophen Ernährungsbedingungen O—O, sowie mit Glukose im Licht □—□ und im Dunkeln ▲—▲. Glukosegabe zum Zeitpunkt 0.

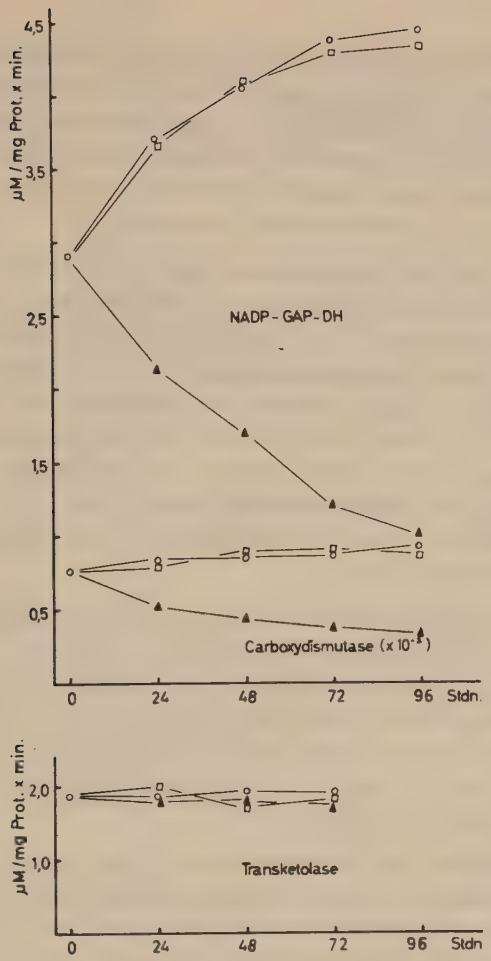

Abb.19 Euglena gracilis; spez. Aktivitäten von NADP-GAP-DH, Carboxydismutase und Transketolase in autotropher Kultur und nach Glukosegabe im Licht und im Dunkeln. Zeichen wie in Abb.18

hältnis Chlorophyll pro Gesamt-N, Abb.18) zurückgeführt werden (vgl. Chlorella luteoviridis). In der heterotrophen Dunkelkultur erfolgt entsprechend der verhinderten Chlorophyllbildung keine Neusynthese der Fermente NADP-GAP-DH und Carboxydismutase. Dies kommt in einer Abnahme der spez. Aktivität beider Fermente zum Ausdruck.

Charakteristisch für die untersuchten Chlorella-Arten waren Aktivitätssteigerungen des Zwischenfermentes in den mit Zucker ernährten Algen. Bei Euglena gracilis konnte nur in der heterotroph angezogenen Kultur eine vermehrte Aktivität gegenüber der autotrophen Vergleichskultur erfaßt werden (Abb.20). Wenn nicht durch die sehr niedrigen spez. Aktivitäten des Fermentes mögliche Unterschiede zwischen autotroph und mixotroph gehaltenen Algen verdeckt werden, stellt dies eine weitere Bestätigung der Ähnlichkeit beider Lichtkulturen dar.

Entsprechend den Erfahrungen bei Chlorella luteoviridis sind die spez. Aktivitäten der NAD-GAP-DH in den mit Zucker ernährten Zellen im Dunkeln wie im Licht höher als die der unter autotrophen Bedingungen belassenen Kultur. (Abb.20) Die erhöhte Aktivität in der mixotrophen Kultur spricht für eine Aktivierung des glycolytischen Reaktionsweges nach Glukosegabe im Licht.

Die spez. Aktivitäten der Transketolase unterliegen in den drei Ernährungstypen keinen Veränderungen.(Abb.19) Da dieses Ferment sowohl im Plastiden als auch im Cytoplasma lokalisiert ist, muß mit einer Kompensation der Aktivitätsänderung des Plastidenfermentes durch diejenige des cytoplasmatischen Fermentes gerechnet werden.

GOT und NADP-Glutamat-DH (Abb.20) ändern gleichartig unabhängig von der Ernährungsform ihre spez. Aktivitäten, wobei die GOT mit zunehmendem Kulturalter immer ansteigt und die Glutamat-DH entsprechend hinter der allgemeinen Proteinsynthese zurückbleibt.

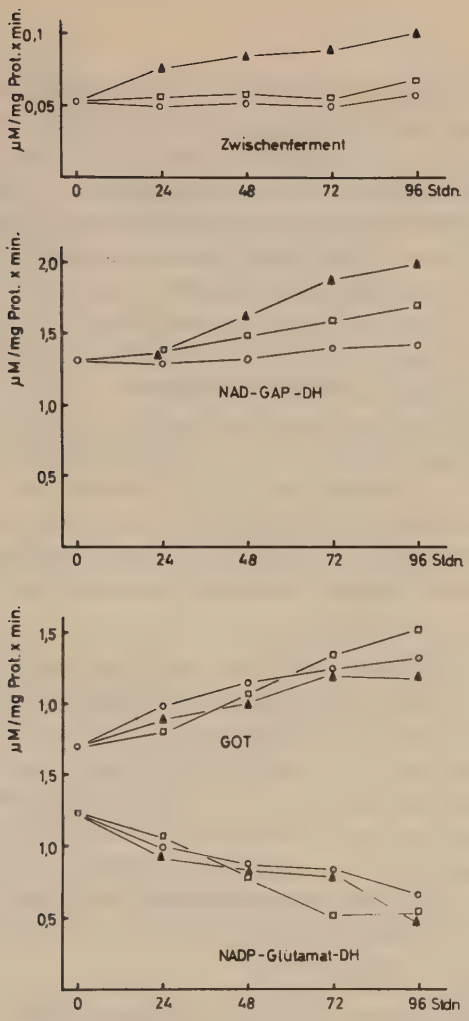

Abb.20 Euglena gracilis; spez. Aktivitäten von Zwischenferment, NAD-GAP-DH, GOT und Glutamat-DH in autotropher Kultur und nach Glukosegabe im Licht und im Dunkeln.
Zeichen wie in Abb.18

Bezieht man die spez. Aktivität der NADP-GAP-DH und der Carboxydismutase auf das Verhältnis Chlorophyll/Gesamt-N der Zellen, so erhält man für die autotrophe und mixotrophe Kultur annähernd gleiche und konstante Werte. (Abb.21) Die höhere Lage in der heterotrophen Kultur könnte durch einen größeren Anteil von Strukturprotein und damit durch einen geringeren an extrahierbarem Protein in den Zellen zusammenhängen; dadurch stünde einer relativ hohen spez. Aktivität der Fermente ein vergleichsweise zu niedriges Verhältnis Chlorophyll/Gesamt-N gegenüber. Nach Bezugnahme der spez. Aktivität der Transketolase und der NAD-GAP-DH auf das Verhältnis Chlorophyll/Gesamt-N ergeben sich die in Abb.21 wiedergegebenen Werte. Die höhere Lage der Kurve für die heterotrophe Kultur spricht dafür, daß in der Dunkelkultur mit Glukose die Aktivität der letztgenannten Fermente auf eine erhöhte Synthese außerhalb des Chloroplasten zurückgeführt werden kann.

Einen zusammenfassenden Überblick auf die Aktivitätsunterschiede der untersuchten Fermente bei Euglena gracilis ist in Abb.22 (oben) wiedergegeben. Deutlich höhere Aktivitäten in der heterotrophen Kultur liegen beim Zwischenferment und bei der NAD-GAP-DH vor. Ihnen gegenüber stehen NADP-GAP-DH und Carboxydismutase mit niedrigeren Aktivitäten im Vergleich zur autotrophen Anzucht. Aus der Darstellung sind keine charakteristischen Unterschiede innerhalb der drei Kulturen für Transketolase, GOT und Glutamat-DH zu entnehmen.

Bei einem Vergleichsversuch mit Acetaternährung stellte sich heraus, daß das Fermentsystem unter diesen Bedingungen variabler ist. (Abb.22, unten) Der Einfluß des Acetats macht sich hier im Gegensatz zur Glukoseernährung auch unter mixotropher Anzucht bemerkbar. NAD-GAP-DH, Aldolase und besonders Glutamat-DH besitzen in der mixotrophen und heterotrophen Kultur höhere Aktivitäten als in der autotroph belassenen Parallele. Dagegen liegt die Aktivität

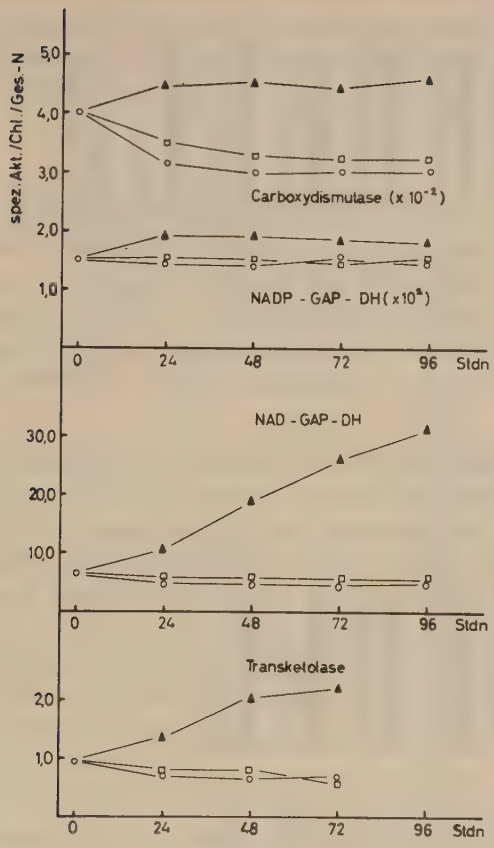

Abb.21 Euglena gracilis; spez. Aktivitäten (/u Mol pro 1 Minute x mg Extraktprotein) von Carboxydismutase, NADP-GAP-DH, NAD-GAP-DH und Transketolase bei Bezugnahme auf das Verhältnis Chlorophyll zu Gesamt-N in autotropher Kultur sowie nach Glukosegabe im Licht und im Dunkeln. Zeichen wie in Abb.18

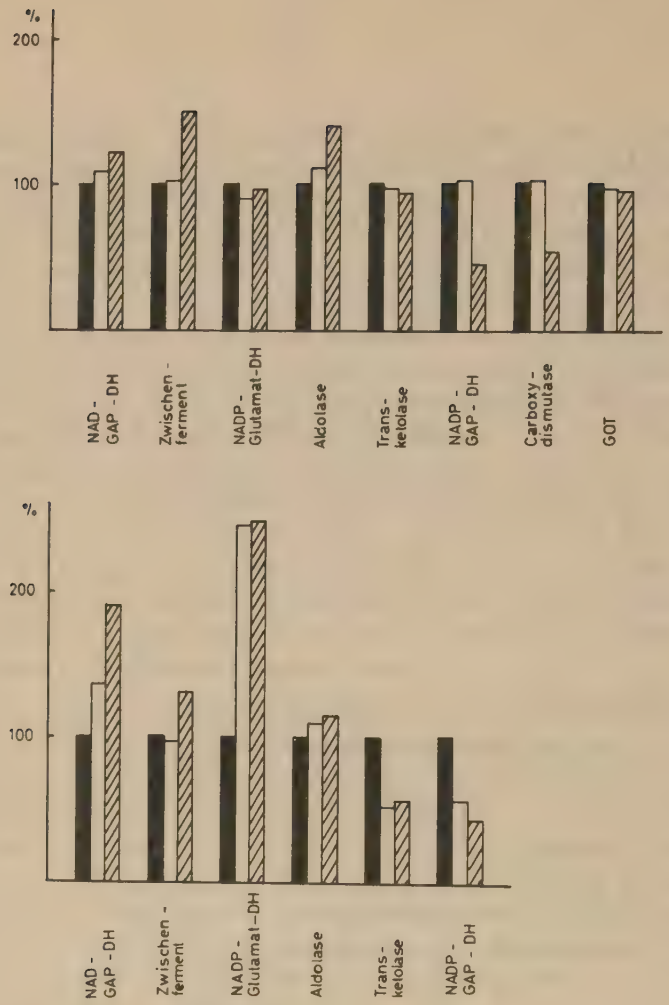

Abb.22 Euglena gracilis; Fermentaktivitäten in der 48.Stunde nach Zugabe von Glukose (oben) bzw. Acetat (unten) zu einer autotroph angezogenen Kultur.
Darstellung der Aktivitäten der untersuchten Fermente im Vergleich zur autotrophen Kultur.

autotrophe Kultur

Kultur mit Glukose bzw. Acetat im Licht

Kultur mit Glukose bzw. Acetat im Dunkeln

des Zwischenfermentes nur in der heterotrophen Kultur wenig höher. Transketolase und NADP-GAP-DH weisen unter autotrophen Kulturbedingungen bedeutend höhere Aktivitäten als in mixotrophen und heterotrophen Acetatanzuchten auf.

5. Chlamydomonas eugametos MOEWUS, Stamm 11-5b

Unter den einzelligen Algen sind einige wenige bekannt geworden, die ausschließlich mit Hilfe der Photosynthese zu wachsen vermögen. Diese Arten, die organische Kohlenstoffquellen für sich nicht nutzbar machen können, werden nach PRINGSHEIM (1959) als obligat photoautotroph bezeichnet.

J.C.LEWIN (1950) versuchte ohne Erfolg Chlamydomonas moewusii mit über 60 verschiedenen Zusätzen zum Kulturmedium unter Lichtabschluß zu kultivieren. Auch der von WETHERELL (1958) untersuchte Stamm von Chlamydomonas eugametos konnte nicht unter heterotrophen Bedingungen gezogen werden. In der nachfolgenden Arbeit wurde Chlamydomonas eugametos, Stamm 11-5b, der als sehr leichtwüchsig bekannt ist, als Beispiel für obligat photoautotrophe Algen herangezogen.

a) Wachstum der Kulturen

Die Wachstumsdaten (Abb.23) zeigen, daß sich die Kulturen im Licht sowohl mit als auch ohne Glukose völlig identisch verhielten. In beiden Anzuchten nimmt das Trockengewicht innerhalb der ersten 24 Stunden um etwa 80% zu. In der gleichen Zeit findet in der dunkelgehaltenen Kultur keine Substanzproduktion statt. Die Abnahme des Trockengewichts nach Übergang in heterotrophe Bedingungen zeigt an, daß die im Licht gebildeten Speicherstoffe im Dunkeln veratmet werden. Bereits nach 24 Stunden beträgt das Trockengewicht nur noch 60% des Ausgangswertes. Eine Chlorophyllsynthese und eine Stickstoffzunahme konnten im Dunkelversuch mit Glukose nicht beobachtet werden.

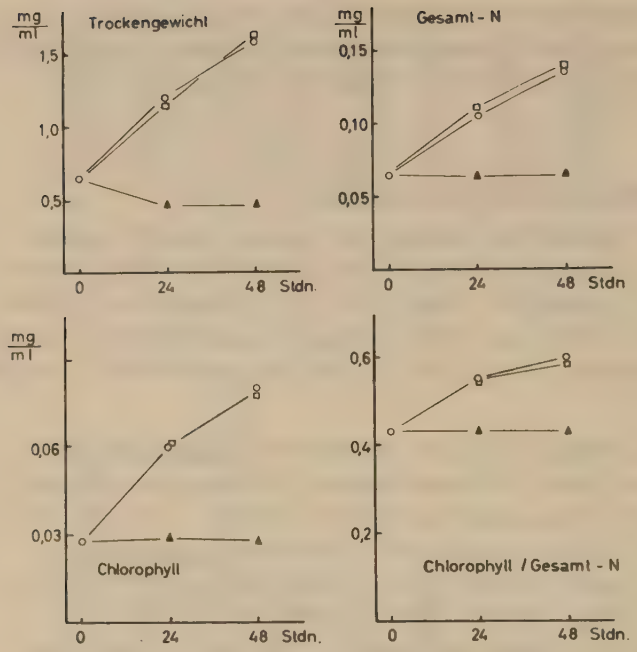

Abb.23 Anzuchtdaten von Chlamydomonas eugametos unter autotrophen Bedingungen ○—○ sowie nach Glukosegabe im Licht □—□ und im Dunkeln ▲—▲ .
Glukosegabe zum Zeitpunkt 0

b) Fermentaktivitäten

Tabelle II gibt eine Übersicht über die spez. Aktivitäten der untersuchten Fermente der Kulturen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Bei der überwiegenden Zahl der Fermente wurden innerhalb der drei Kulturen keine Unterschiede der spez. Aktivitäten beobachtet. Nur bei der Glutamat-DH und bei GOT (Abb.24) verändern sich die Aktivitäten beim Übergang in die Dunkelzeit. Die Abnahme der spez. Aktivität bei der Glutamat-DH ist bereits bei vorverdunkelter autotropher Chlorella pyrenoidosa beobachtet worden. Da die Abnahme auch ohne Glukose im Dunkeln erfolgt, ist diese also nicht als Effekt des Zuckers zu deuten. GOT nimmt in der Dunkelzeit demgegenüber an Aktivität zu. Die Änderungen der spez. Aktivität von Glutamat-DH und GOT stehen im Falle von Chlamydomonas nicht im Zusammenhang mit der Neusynthese von Protein, da eine solche hier kaum stattfindet, jedenfalls nicht mit den üblichen Analysenmethoden faßbar ist.

Tabelle II

Vergleich der spez. Aktivitäten (/u Mol/mg Protein x min) von Fermenten aus Chlamydomonas eugametos bei Anzucht der Algen unter autotrophen Bedingungen und mit Glukose im Licht und im Dunkeln.

	autotroph	+ Glucose	
		Licht	Dunkel
Aldolase	0,7	0,73	0,69
Zwischenferment+)	0,0028	0,0024	0,0033
Transketolase	0,503	0,52	0,48
Carboxydismutase	0,21	0,22	0,266
NADP-GAP-DH	3,45	3,35	3,6
NAD-GAP-DH	0,96	1,01	0,99
NADP-Gl-DH	5,05	4,9	2,45
GOT	0,98	1,1	2,03

+) = Aktivität im gemörserten Extrakt bestimmt

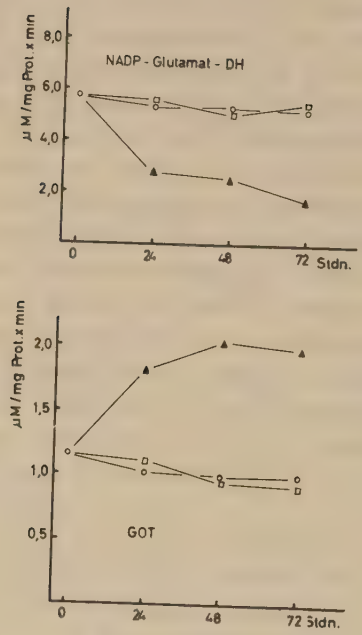

Abb.24 Chlamydomonas eugametos; spez. Aktivitäten von Glutamat-DH und GOT autotropher Kultur und mit Glukose im Licht und im Dunkeln und nach Zugabe von Glukose (zum Zeitpunkt 0) im Licht und im Dunkeln.
Zeichen wie in Abb.23

5. Prototheca portoricensis var. ciferrii PRINGSHEIM, Stamm 263-12

Als Beispiel einer obligat heterotrophen Alge wurde Prototheca portoricensis var. ciferrii herangezogen. Entsprechend dem Fehlen des photosynthetischen Apparates konnte bei Prototheca keine NADP-GAP-DH nachgewiesen werden. Entgegen dem Befund von CIFERRI (1961), daß Prototheca zopfii RuDP nicht zu carboxylieren vermag, zeigte sich in unseren dunkelgezogenen Kulturen eine geringe, aber doch sicher bestimmbare Aktivität der Carboxydismutase; Belichtung hebt bemerkenswerterweise den Effekt auf. Diese Feststellung ist im Zusammenhang mit der Beobachtung von MENKE und FRICKE (1962) bemerkenswert, daß dieser Prototheca-Stamm Plastiden ohne distinkte Innenstrukturen (Leucoplasten) enthält. Eine Anwesenheit der Carboxydismutase bei fehlender NADP-GAP-DH beobachteten FULLER und GIBBS (1959) auch an der farblosen Alge Astasia. Eine vergleichsweise zu grünen Algen hohe Aktivität der NAD-GAP-DH ist charakteristisch für Prototheca. Zwischenferment und 6-PG-DH, die bei allen untersuchten Algen besonders empfindlich sind, aber in heterotrophen Anzuchten sonst doch mit relativ hohen Aktivitäten nachweisbar sind, ergeben in den Extrakten von Prototheca nur geringe spez. Aktivitäten. In Tabelle III sind die spez. Aktivitäten der getesteten Fermente zusammengestellt. Es werden dabei Dunkelkulturen und bei 5000 Lux gehaltene Kulturen verglichen. Die von KOWALLIK (1965) gefundene Wachstumshemmung im Licht macht sich bei dieser Beleuchtungsstärke noch nicht bemerkbar.

Tabelle III

Vergleich der spez. Aktivitäten (/u Mol/mg Protein x min) bei Prototheca portoricencis var. ciferrii in Licht- und Dunkelkultur.

	Lichtkultur	Dunkelkultur
Zwischenferment	0,082	0,048
6-PG-DH	0,072	0,106
NADP-GAP-DH	0,0	0,0
Carboxydismutase	0,0	0,0160
NAD-GAP-DH	5,25	5,1
Aldolase	0,268	0,277
Transketolase	0,31	0,37
GOT	2,08	2,09
NADP-Glutamat-DH	1,76	1,5

IV. Diskussion

Bei allen Versuchen, die physiologische Beeinflussung und Regulation von Fermenten mit Hilfe von Fermenttests in vitro zu erfassen, steht man der Schwierigkeit gegenüber, daß sich mit der Fermentextraktion die Aktivitäten nach der positiven oder negativen Seite stark verschieben können. Hiervon können die einzelnen Enzyme in sehr verschiedenem Ausmaß betroffen sein. Als extremes Beispiel sei die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase erwähnt, deren Aktivität in vitro bei den von uns untersuchten Objekten in starkem Maße von der Art des Zellaufschlusses abhängt. Von vornherein kann auch nicht erwartet werden, daß die für einzelne Fermente gemessenen spez. Aktivitäten in ihrer Höhe bei den einzelnen Algen übereinstimmen. Ein solcher Vergleich würde allein schon voraussetzen, daß das extrahierte Gesamtprotein, das als Bezugsgröße herangezogen werden muß, überall den gleichen Anteil des betreffenden Ferments enthält. Damit aber ist im allgemeinen nicht zu rechnen. Wiederum als extremes Beispiel kann hier die Glutamat-Dehydrogenase angeführt werden, deren spez. Aktivität bei Chlorella luteoviridis sechsmal so hoch ist wie unter vergleichbaren Bedingungen bei Chlorella pyrenoidosa. Wenn in der vorliegenden Arbeit die Fermentaktivitäten in Beziehung zum Ernährungstyp gesetzt werden sollen, so erscheinen daher für das Verhalten in vivo besonders solche Befunde relevant, die sich in zusammengehörigen Fermentgruppen ähnlich auswirken und in einer einleuchtenden Beziehung zu den in vergleichenden Kulturversuchen ermittelten Wachstumsdaten stehen. Beachtet man diese Gesichtspunkte, so lassen sich bei aller notwendigen Skepsis gegenüber der biologischen Aussagekraft von Fermenttests eine Reihe enzymologischer Daten erbringen, die zur Kennzeichnung der Algen in ihren verschiedenen Verhalten in autotrophen, mixotrophen und heterotrophen Ernährungsbedingungen dienen können.

Unabhängig von dem Artefaktproblem ergibt sich bei der Bewertung der beobachteten Änderungen der spez. Fermentaktivitäten die Frage, ob diese eine echte Aktivierung oder Inaktivierung am vorhandenen Enzym darstellt oder ob im Zuge der stets ablaufenden Eiweißsynthese die Bildung des untersuchten Enzyms gefördert oder gehemmt ist. Der erstere Fall könnte dann vorliegen, wenn unmittelbar nach Belichtung und vielleicht mehr noch nach Verdunklung eine rasche Aktivitätsänderung nachzuweisen ist. Ein Beispiel dafür bietet die auffällige Verminderung der Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase nach Ausschaltung der Belichtung in autotroph gezogenen Chlorella pyrenoidosa und Chlamydomonas eugametos. Auch in solchen Fällen ist jedoch nicht auszuschließen, daß die gemessenenen Aktivitätsänderungen auf einen internen Umbau innerhalb des Proteinumsatzes zurückzuführen sind; der unabhängig von der Proteinnettosynthese abläuft. Solche Fälle kommen nach BERGER (1964) im Verlauf der Zellentwicklung von Chlorella pyrenoidosa vor. Eine Verschiebung der Fermentproduktion innerhalb der Neubildung (Netto- und Bruttosynthese) des in den Testextrakt eingehenden Bezugsproteins ist in den Fällen sehr wahrscheinlich, wo im gleichen Extrakt ein Ferment aktiviert und ein anderes inaktiviert erscheint. In diesem Falle handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine gegenläufige Reaktion von zwei einzelnen gerade betrachteten Enzymen, sondern um ein entsprechendes Verhalten ganzer Komplexe, z.B. der Fermente des cytoplasmatischen Bereichs gegenüber denjenigen, die ihre Funktion im Photosyntheseapparat ausüben.

Bei kritischer Berücksichtigung aller genannten Gesichtspunkte lassen sich aus unseren vergleichenden Versuchen immerhin einige Merkmale für die enzymologische Umstellung beim Wechsel der Ernährungsform erfassen. Wir betrachten zunächst den Übergang von autotropher zu heterotropher Kultur. Die spez. Aktivitäten (also die auf das Extraktprotein bezogenen Werte) des Zwischenfermentes und der

Hexokinase - bei Chlorella pyrenoidosa nachweislich auch die Phosphoglucomutase - sind im Zustand der heterotrophen Ernährung erhöht, während gleichzeitig die Carboxydismutase und die NADP-GAP-DH Verluste erleiden. Dies gilt nicht für Chlamydomonas eugametos; aber gerade das kann man erwarten, da Chlamydomonas ein heterotrophes Wachstum nicht kennt. Man kann aus diesen Daten die Vorstellung ableiten, daß beim Übergang zum heterotrophen Dunkelwachstum der Pentosephosphatcyclus als Lieferant für $NADPH_2$ verstärkt eingesetzt wird und zugleich die Zellsynthesen von den Chloroplasten weitgehend in den cytoplasmatischen Bereich verlagert werden. Der Pentosephosphat-Weg könnte in diesem Falle auch Bausteine für Dunkelsynthesen ersetzen, die in der photosynthetisch tätigen Zelle aus dem Calvincyclus (der oft als der reduktive Pentosephosphatcyclus bezeichnet wird) stammen.

Die Rückbildung des Chloroplasten nach Überführung in heterotrophe Bedingungen ist bei den einzelnen Algentypen verschieden. In unserem Falle ist er in der Reihe Chlorella pyrenoidosa, Chlorella luteviridis, Euglena gracilis zunehmend ausgeprägt, was in dem entsprechenden Rückgang des Chlorophyllgehaltes zum Ausdruck kommt. Bezieht man nun jeweils die Aktivität der Plastidenfermente auf das noch vorhandene Chlorophyll, so erhält man annähernd konstante Werte, die allerdings für die einzelne Algenart verschieden liegen. Die letztere Beobachtung kann auf artspezifischen Unterschieden der Proteinextraktion (Bezugsgrößeneffekt) beruhen, während die Konstanz des Verhältnisses Ferment zu Chlorophyll einen Hinweis auf das Bestehen von Funktionseinheiten zwischen Ferment und Pigment gibt. In diesem Zusammenhang sei auf BRAWERMAN et al. (1960) verwiesen, die bei Euglena gracilis einen Parallelverlauf von Chlorophyll und NADP-GAP-DH nachgewiesen haben. Die weitere Beziehung zwischen Fermentaktivitäten (Carboxydismutase und photosynthetischer Pyridinnucleotid-Reduktase) und Photosynthese hat SMILLIE (1962) an Erbsenblättern gezeigt.

Die Zunahme der plasmatischen Fermente scheint in ihrem Ausmaß nicht von der Chloroplastenreduktion bestimmt zu sein. Lediglich die Vermehrung der NAD-GAP-DH erfolgt dem Chlorophyllverlust entsprechend in der Reihe Chlorella pyrenoidosa, Chlorella luteoviridis, Euglena gracilis, wobei es sich bei Chlorella pyrenoidosa nur um eine gegenüber der NADP-GAP-DH geringere Abnahme der spez. Aktivität handelt. Besondere Erwähnung verdient der Befund, daß die mit der Umschaltung auf heterotrophe Ernährung verbundene Aktivierung der cytoplasmatischen Fermente dem Rückgang der Plastidenfermente deutlich vorangeht. Daraus ergibt sich für eine kausale Betrachtung, daß die Wirkung der Glukosezufuhr nicht primär am System der Chloroplasten ansetzt, vielmehr ist wahrscheinlicher, daß die Förderung des cytoplasmatischen Systems sekundär zur Reduktion des Chloroplastenbereichs führt.

Schwierig zu beurteilen sind die Änderungen, die man an den Fermenten beobachtet, die sowohl dem cytoplasmatischen Bereich als auch den Plastiden angehören (SMILLIE 1963); wenn es sich dabei auch um Isoenzyme handeln dürfte, so sind diese im Test nicht zu unterscheiden. Insgesamt sprechen die geringen Änderungen von Aldolase und Transketolase beim Übergang von autotropher zu heterotropher Ernährung dafür, daß sich der Verlust bei der Chloroplastenreduktion durch eine Zunahme im Cytoplasma weitgehend ausgleicht.

Wir vergleichen nun das enzymatische Verhalten von Algen, die mit Glukose im Licht gezogen sind (sog. mixotrophe Ernäherungsbedingung). Hier zeigt sich wiederum, daß der obligat photoautotrophe Chlamydomonas-Stamm auf die Glukosegabe nicht mit einem Ansprechen von Fermentaktivitäten reagiert. Dies kann wie im Fall der Zuckergabe im Dunkeln (s.o.) einfach auf einer Sperre für die Glukoseaufnahme beruhen. Bemerkenswerterweise gilt ähnliches für Euglena gracilis bei Zuckergabe im Licht. Dies legt den

Schluß nahe, daß Euglena gracilis die gebotene Glukose im Licht nicht in ihre Assimilation einbezieht; diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß der verwendete Euglena-Stamm mit und ohne Glukose im Licht annähernd gleich wächst. Ob Euglena im Licht gegenüber Glukose völlig inert ist, muß freilich wegen der geringen Zunahme der NAD-GAP-DH und auf Grund der Erfahrungen von ULRICH (1963) über eine Glukoseaufnahme in mixotropher Anzucht bezweifelt werden.

Grundlegend anders als Euglena reagieren die im Licht mit Glukose gezogenen Chlorella-Stämme. Hier treten die für heterotrophe Zellen kennzeichnenden enzymatischen Merkmale auch bei der mixotrophen Ernährung deutlich in Erscheinung. Die Photosynthesefermente (insbesondere NADP-GAP-DH) liegen bei Chlorella pyrenoidosa in ihrer Aktivität zwischen autotropher und heterotropher Anzucht, bei Chlorella luteoviridis niedriger als bei heterotropher Ernährung. Auch hier ist wieder eine engere Beziehung zum Chlorophyll insofern nachweisbar, als Chlorella luteoviridis bei optimaler Wachstumsgeschwindigkeit mit Glukose im Licht den Anteil ihres Chlorophyllapparates in wesentlich stärkerem Maße reduziert, als dies bei Chlorella pyrenoidosa der Fall ist.

Die cytoplasmatischen Fermente in beiden Chlorella-Arten liegen in den mixotrophen Kulturen bei Aktivitäten, die gegenüber den autotrophen Anzuchten erhöht sind. Hier reagiert insbesondere das Zwischenferment mit einer Zunahme der spez. Aktivität, die den entsprechenden Effekt im Dunkeln (heterotrophe Anzucht) sogar deutlich übersteigt (Chlorella pyrenoidosa). Es ist daher anzunehmen, daß im mixotrophen Zustand die nichtphotosynthetische Glukoseverwertung gegenüber dem autotrophen Wachstum beträchtlich an Bedeutung gewinnt. Beide Chlorella-Arten wachsen tatsächlich mit Glukose im Licht optimal, d.h. besser als unter autotrophen oder heterotrophen Bedingungen.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse die bisher schon mit Einzelbefunden begründbare Auffassung, daß die große physiologische Variabilität, die bisher aus den Daten der Ernährungs- und Wachstumsphysiologie belegt worden ist, grundsätzlich auch auf dem Niveau der Enzymwirkungen erfaßt werden kann. Damit wird wenigstens in günstig gelagerten Fällen das Problem der Variabilität und der artspezifischen Verschiedenheiten in den engeren Bereich biochemischer Einzelvorgänge verlegt. Eine Aufgabe für die Zukunft wird es sein, dieses Verhalten auf der nächst höheren Stufe der Steuerungsmechanismen noch exakter zu charakterisieren, wie dies bereits bei einzelnen Bakterien in weitgehendem Maße möglich geworden ist.

V. Zusammenfassung

1. Einige in ihrem Ernährungsmodus quantitativ und qualitativ verschiedene Grünalgen wurden unter rein photosynthetischen Bedingungen (autotroph) sowie mit Glukose im Licht (mixotroph) und im Dunkeln (heterotroph) kultiviert.

2. Beim Übergang von der autotrophen zur mixotrophen oder heterotrophen Ernährung wurden die Änderungen der spez. Aktivitäten einiger Fermente verfolgt. Dies waren aus dem Photosynthesebereich: NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Carboxydismutase, aus dem cytoplasmatischen Bereich: Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Hexokinase, Phosphoglucomutase und NAD-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase sowie die Fermente Aldolase und Transketolase. Einige Vergleichsversuche wurden auch mit Glutamat-Dehydrogenase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase angestellt.

3. Bei Chlorella pyrenoidosa und Chlorella luteoviridis verändern sich die Aktivitäten der Photosynthesefermente jeweils in enger Beziehung zum Chlorophyllgehalt. Die Zufuhr von Glukose begünstigt im Licht und im Dunkeln die cytoplasmatischen Fermente gegenüber den Photosynthesefermenten.

4. Bei Chlorella pyrenoidosa geht im Übergang zur heterotrophen Ernährung die Zunahme der cytoplasmatischen Fermente derjenigen der Photosynthesefermente voran.

5. Bei Euglena gracilis bewirkt Zuckerzufuhr nur im Dunkeln eine gegenläufige Verschiebung der Aktivitäten von photosynthetischen und cytoplasmatischen Fermenten. Die spez. Aktivitäten der ersteren vermindern sich auch hier proportional zum Chlorophyllgehalt. Zuckergabe im Licht ist ohne Einfluß; dagegen werden bei Acetatzufuhr schon im Licht enzymatische Kennzeichen für Heterotrophie nachweisbar.

6. Bei Chlamydomonas eugametos als obligat photoautotrophem Ernährungstyp läßt sich bei Angebot von Glukose weder im Licht noch im Dunkeln eine Aktivitätsänderung von Enzymen nachweisen.

7. In Prototheca portoricensis var. ciferrii wurde keine NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase gefunden; dagegen war eine sehr geringe Aktivität der Carboxydismutase nachzuweisen.

8. Von den untersuchten Fermenten sprach lediglich die Glutamat-Dehydrogenase unabhängig von der Zuckerzufuhr allein auf Verdunklung mit einer Inaktivierung an.

9. Die Beziehungen zwischen Ernährungsmodus und Fermentaktivitäten werden an Hand der Versuchsdaten im einzelnen diskutiert.

VI. Anhang

1. Im Text verwendete Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat, EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure, FDP = Fructose-1,6-diphosphat, G-6-P = Glukose-6-phosphat, G-6-P-DH = Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GDH/TIM = α-Glycerophosphatdehydrogenase/ Triosephosphatisomerase, Gl-DH = NADP-Glutamatdehydrogenase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, α-KG = α-Ketoglutarat, MDH = Malatdehydrogenase, NAD bzw. $NADH_2$= oxyd. bzw. red. Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, NADP bzw. $NADPH_2$ = oxyd. bzw. red. Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat, PKG = 3-Phosphoglyceratkinase, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 6-PG = 6-Phosphogluconat, 6-PG-DH = 6-Phosphogluconat-dehydrogenase, R-5-P = Ribose-5-phosphat, RuDP = Ribulose-1,5-diphosphat, TPP = Thiaminpyrophosphat, Xu-5-P = Xylulose-5-phosphat.

2. Fermenttests

Die Aktivitäten aller untersuchten Fermente wurden im optischen Test nach WARBURG in einfacher oder gekoppelter Reaktion bestimmt. Die Messung erfolgte am Eppendorfphotometer bei einer Wellenlänge von 366 nm.

Die auf ihre Fermentaktivität geprüften Extraktmengen waren so eingestellt, daß die Extinktionsdifferenz im Bereich von Δ E = 0,005 und Δ E = 0,04 verblieb. In den meisten Fällen erfolgte eine Parallelmessung, in anderen wurde eine zusätzliche Messung mit doppelter Extraktmenge durchgeführt. Startsubstanz war in jedem Fall das Substrat der Fermentreaktion, das nach einer Vorinkubation von 5-10 Minuten bei 25°C zum Reaktionsgemisch gegeben wurde.

Die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit wurde in internationale Einheiten umgerechnet (Report of the Commission on Enzymes, 1961) und auf den Proteingehalt des Extrakts bezogen. Daraus ergibt sich die spezifische Aktivität: 1 u Mol umgesetztes Substrat pro Minute pro mg/ml Extraktprotein.

Die im folgenden aufgeführten quantitativen Testzusammensetzungen entsprechen den optimalen Bedingungen für die betreffenden Fermente. Nach SCHMIDT und SCHMIDT (1962/63) und WIELAND und PFEIDERER (1963) können die für einen Organismus gefundenen optimalen Testbedingungen nicht auf andere Arten übertragen werden. Es war notwendig, die bei COLOWICK und KAPLAN (1955 ff.) und BERGMEYER (1962) angegebenen Testansätze zu überprüfen und gegebenenfalls neu zusammenzustellen.

Testzusammensetzungen

Die Bestimmung der Aldolase wurde nach Angaben von FEWSON et al. (1962) durchgeführt. Im einzelnen setzte sich der Test zusammen:

1,42 ml	Phosphat-Puffer,	0,1 M, pH 7,6
0,01 "	GDH/TIM	1 mg/ml
0,02 "	$NADH_2$	10 mg/ml
0,05 "	F-1,6-P	0,2 M

Extrakt und Wasser ad 2 ml.
Beginn der Messung: 1 Minute nach Substratgabe.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen wurden im Rücktest bestimmt. Nach DELBRÜCK et al. (1959) ist eine Aktivitätsbestimmung in Rohextrakten nur auf diesem Wege möglich. Da die Wechselzahl der Triosephosphatisomerase etwa 1000 mal größer ist als die der GAP-DH, kann im Arsenattest nicht die volle Aktivität der GAP-DH erfaßt werden. Im Arsenattest liegen die ermittelten Aktivitäten 5-8 mal niedriger als im Rücktest. Versuche, die Aktivität der Fermente durch Zusatz von 3-Phosphoglygeratkinase, Enolase und Pyruvatkinase zu erhöhen, waren erfolglos. Die NAD- und die NADP-abhängigen Dehydrogenasen wurden mit der gleichen Testzusammensetzung bestimmt.

1,52 ml Tris-HCl-Puffer 0,05 M, pH 7,6 für NAD- und 8,6 für NADP-abhängige
0,1 ml Cystein 0,1 M, vor Gebrauch mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt
0,02 ml PGK 0,4 mg/ml
0,05 ml ATP 0,1 M
0,03 ml $NADH_2$ bzw. $NADPH_2$, 10 mg/ml
0,02 ml $MgCl_2$ 0,5 M
0,05 ml 3-Phosphoglycerat, Na-Salz, 0,05 M
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment) wurde nach Angaben von KORNBERG und HORECKER (1955) bestimmt:

1,5 ml Tris-HCl-Puffer, 0,05 M
0,02 ml $MgCl_2$ 0,5 M
0,03 ml NADP 10 mg/ml
0,05 ml Glukose-6-Phosphat 0,05 M
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Das pH-Optimum des Ferments in Chlorella pyrenoidosa lag über pH 8,0. Es wurde bei pH 8,6 bestimmt. In den Extrakten der übrigen Algen wurde bei pH 7,8 gemessen.

Der Testansatz zur Bestimmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase setzte sich ähnlich wie der für das Zwischenferment zusammen. Statt G-6-P wurde 6-PG als Substrat der Fermentreaktion gegeben.

Die Bestimmung der Hexokinase erfolgte im gekoppelten Test über das Zwischenferment:

1,0 ml Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,4
0,02 ml $MgCl_2$ 0,5 M
0,05 ml ATP 0,1 M
0,03 ml NADP 10 mg/ml
0,02 ml G-6-P-DH 0,02 mg/ml
0,1 ml Glukose 0,033 M
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Zur Ermittlung der Phosphoglucomutaseaktivität wurde der gleiche Testansatz verwendet. ATP wurde herausgelassen; als Substrat wurde statt Glukose Glukose-1-phosphat zur Reaktionsmischung gegeben. Das pH-Optimum lag zwischen pH 8,4 und 8,6.

Der Test für die Transketolase wurde nach Angaben von HORECKER und SMYRNIOTIS (1955) zusammengestellt:

1,0 ml Glycylglycinpuffer, 0,05 M, pH 7,6
0,1 ml Xu-5-P/R-5-P 3% im Verhältnis 2:1
0,02 ml $MgCl_2$/TPP
0,02 ml $NADH_2$ 10 mg/ml
0,1 ml Cystein pH 7,8
0,01 ml GDH/TIM 0,05 mg/ml
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Die Carboxydismutaseaktivität durch Bestimmung des Reaktionsproduktes 3-PG ermittelt. Der Ansatz der Carboxydismutasereaktion hatte folgende Zusammenstellung:

0,5 ml Tris-HCl-Puffer 0,1 M, pH 7,8
0,1 ml Cystein pH 7,8
0,3 ml $KHCO_3$ 0,5 M
0,02 ml $MgCl_2$ 0,5 M
und Extrakt.

Nach 5 Minuten Inkubation bei 25°C wurden

0,02 ml RuDP 20 mg RuDP-Produkt/ml zugegeben

und die Reaktion 10 Minuten ablaufen lassen. Die Reaktion wurde mit

0,1 ml HCl 0,1 M gestoppt und das Reaktionsgefäß eine Minute in kochendes Wasser gegeben. Endvolumen 1,5 ml.

Nach Zentrifugieren des Niederschlages wurde die gebildete 3-PGS enzymatisch bestimmt (CZOCK und ECKERT 1962):

0,2 ml Überstehende Reaktionsmischung
0,04 ml ATP 0,2 M
0,02 ml GDH/TIM 0,05 mg/ml
0,02 ml 3-PGA-DH 0,05 mg/ml
0,1 ml Cystein pH 7,8
0,02 ml $NADH_2$ 10 mg/ml
0,02 ml $MgCl_2$ 0,5 M
0,02 ml 3-PGK 0,4 mg/ml
1,56 ml Tris-HCl-Puffer 0,1 M, pH 7,8

Startsubstanz war 3-PGK.

Ru-1,5-P wurde nach HORECKER et al. (1957) hergestellt. Die Fermente Pentosephosphat-Isomerase nach HURWITZ et al. (1956) und Phosphoribulokinase nach JACOBY et al. (1956) wurden aus Spinat isoliert.

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase wurde im gekoppelten Test mit MDH (HOLZER et al. 1958) nach Angaben von BERGMEYER und BERNT (1962) bestimmt.

1,38 ml Tris-HCl-Puffer 0,05 M, pH 8,3
0,05 ml α-KG 0,2 M, mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt
0,05 ml Pyridoxalphosphat 10 mg/ml Trispuffer pH 8,3
0,03 ml $NADH_2$ 10 mg/ml
0,02 ml MDH 0,5 mg/ml
0,2 ml Asparaginat 0,2 M, pH 7,0
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Im Test der NADP-Glutamat-Dehydrogenase waren enthalten:

1,55 ml Phosphat-Puffer 0,05 M
0,03 ml $NADPH_2$ 10 mg/ml
0,05 ml EDTA 20 mg/ml
0,1 ml NH_4Cl 6,0 M
0,07 ml α-KG pH 6,7
Extrakt und Wasser ad 2 ml.

Das von BERGER (1964) bei Chlorella pyrenoidosa gefundene pH-Optimum der NADP-Gl-DH bei 6,7 konnte auch bei Chlorella luteoviridis bestätigt werden (vgl. Abb. 25). In Euglena gracilis und Chlamydomonas

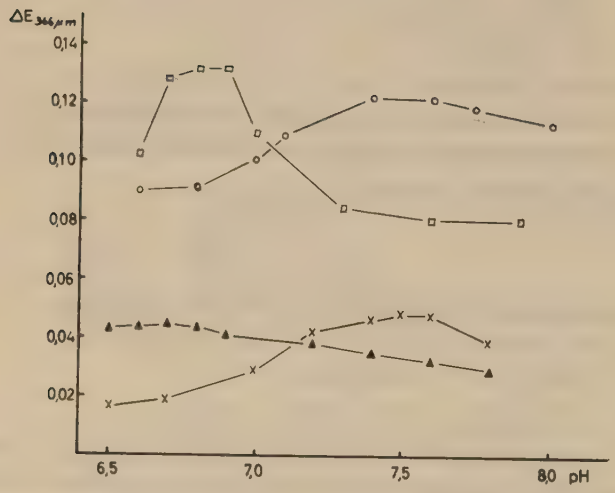

Abb. 25 Abhängigkeit der NADP-Glutamat-DH bei den untersuchten Algen vom pH-Wert.

▲——▲ Chlorella pyrenoidosa

□——□ Chlorella luteoviridis

×——× Euglena gracilis

○——○ Chlamydomonas eugametos

eugametos liegt das Optimum bei pH 7,4 bis 7,6. Die Gl-DH bei Prototheca portoricensis zeigt kein deutliches Maximum. Sie wurde bei pH 7,6 bestimmt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Substrate und Enzympräparate von der Firma Boehringer, Mannheim, das Pyridoxalphosphat von der Firma Roth, Karlsruhe, bezogen.

Literaturverzeichnis

Ben Shaul,Y., H.T.Epstein, and J.A.Schiff, 1965: Studies of chloroplast development in Euglena. 10. The return of the chloroplast to the proplastid condition during dark adaptation. Can. J. Bot. 43, 129-136

Berger,Ch., 1964: Aktivitätsänderungen einiger Enzyme während der Zellentwicklung synchronisierter Chlorella-Zellen. Dissertation, Göttingen

Bergmann,L., 1955: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora (Jena) 142, 493-539

Bergmeyer,H.-U., 1962: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim

Bergmeyer,H.-U. und E.Bernt, 1962: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, in "Methoden der enzymatischen Analyse", S.837-845, Verlag Chemie, Weinheim

Böger,P., 1964: Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. Flora (Jena) 154, 174-211

Brawermann,G., and N.Konigsberg, 1960: On the formation of the TPN-requiring glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase during the production of chloroplasts in Euglena gracilis. Biochem. Biophys. Acta 43, 374-381

Ciferri,O., 1961: Carbon dioxid fixation by the achlorotic alga Prototheca zopfii. Experientia (Basel) 17, 560

Colowick,S.P., and N.O.Kaplan, 1955 ff: Methods in Enzymologie, Academic Press, New York

Cramer,M., and Myers,J., 1952: Growth and photosynthetic charakteristics of Euglena gracilis. Arch. Mikrob. 17, 348-402

Czock,R. und L.Eckert, 1962: D-3-Phosphoglycerat, D-3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, in "Methoden der enzymatischen Analyse", herausgegeb. von H.-U.Bergmeyer, S.224

Delbrück,A., E.Zebe, Th.Bücher, 1959: Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung.
Biochem. Z. 331, 273-296

Dersch,G., 1960: Mineralsalzmangel und Secundärcarotinoide in Grünalgen.
Flora (Jena) 149, 566-603

Devlin,R.M., and A.G.Raymond, 1963: Oxidative enzyme and pathways of glucose metabolism in Chlorella pyrenoidosa (van Niel's strain).
Plant Physiol. 38, suppl. xlvii

Fewson,Ch.A., M.Al-Hafidh, and M.Gibbs, 1962:
Role of aldolase in photosynthesis.
I. Enzyme studied with photosynthetic organisms with special reference to blue-green algae.
Plant Physiol. 37, 402-406

Fuller,R.C., and M.Gibbs, 1959: Distribution of RuDP-carboxylase.
Plant Physiol. 34, 324-329

Gibbs,M., 1952: Triosephosphate-dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the pea plant.
Nature (London) 170, 164-165

Hageman,R.H., and D.I.Arnon, 1955: Changes in glyceraldehyd phosphatedehydrogenase during the life cycle of a green plant.
Arch. Biochem. Biophys. 57, 421-436

Hiller,R.G., and C.P.Wittingham, 1964: The synthesis of amino acids in Chlorella in light and dark.
I. Photosynthesis products in Chlorella.
J. exp. Botany 15, 21-28

Holzer,H. und E.Holzer, 1952: Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Chlorella.
Chem. Ber. 85, 655-663

Horecker,B.L., J.Hurwitz, and P.K.Stumpf, 1957:
The enzymatic synthesis of ribulose-1,5-diphosphate and xylulose-5-phosphate in "Methods in Enzymology". Edited by Colowick & Kaplan,
Vol.III, S.193-195

Horecker,B.L., and P.Z.Smyrniotis, 1955: Transketolase from liver and spinach, in "Methods in Enzymology", edited by Colowick and Kaplan, Vol.I,
S.371-375

Hurwitz,J., A.Weissbach, B.L.Horecker, P.Z.Smyrniotis, 1956: Spinach phosphoribulokinase.
J. Biol. Chem. 218, 769-783

Jacobi,G., 1957: Enzyme des Aminosäurestoffwechsels in Ulva lactuca.
Planta 49, 561-577

Jacobi,G., 1957: Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Extrakten von Ulva lactuca.
Planta 49, 1-10

Jacobi,G., 1957: Vergleichend enzymatische Untersuchungen mariner Grün- und Rotalgen.
Kieler Meeresforschung Bd.XIII, 212-219

Jacoby,W.B., D.O.Brummond, and S.Ochoa, 1959: Formation of 3-phosphoglyceric acid by carbon dioxide fixation with spinach leaf enzymes.
J. Biol. Chem. 218, 811

Kornberg,A., and B.L.Horecker, 1955: Glukose-6-phosphate dehydrogenase, in "Methods in Enzymology", edited by Colowick and Kaplan, Vol.I, S.323-327

Kowallik,W., 1965: Flora (Jena), im Druck

Kuhl,A. und Lorenzen,H., 1964: Handling and culturing of Chlorella, in "Methods of Cell Physiology, Vol.I. ed. by D.M.Prescott, New York, S.159-187

Lewin,J.C., 1950: Obligate autotrophie in Chlamydomonas moewusii GEL.
Science 112, 652-653

Mackiney,G., 1941: Absorption of light by chlorophyll solutions.
J. Biol. Chem. 140, 315-322

Menke,W. und B.Fricke, 1962: Einige Beobachtungen an Prothotheca ciferrii.
Port. Acta Biol., Ser. A 6, 243-252

Neish,A.C., 1951: Carbohydrate nutrition of Chlorella vulgaris. Can. J. Botany 29, 68-78

Ohmann,E., 1963: Verschiedene Mechanismen der Acetat-aktivierung in Grünalgen.
Naturwissenschaften 50, Z 578

Pringsheim,E.G., 1959: Heterotrophie bei Algen und Flagellaten, in Hdb. der Pflanzenphysiologie, hrsg. von W.Ruhland, Bd.XI, S.303-326, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer Verlag 1955

Pringsheim,E.G., 1963: Farblose Algen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1963

Richter,G., 1959: Comparison of enzymes of sugar metabolism in 2 photosynthetic algae: Anacystis nidulans and Chlorella pyrenoidosa. Naturwissenschaften 46, 604

Ruppel,H.G., 1962: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. Flora (Jena) 152, 113-138

Samejima,H., and J.Myers, 1958: On the heterotrophic growth of Chlorella pyrenoidosa. J. Gen. Microbiol. 18, 107-117

Schmidt,E. und F.W.Schmidt, 1962/63: Untersuchungen über optimale Reaktionsbedingungen für Enzymaktivitäten in Leberextrakten, in Extrakten anderer Organe und im Serum. Enzymol. biol. et clin. 2, 201-222

Senger,H., 1962: Über die Wirkung von Glukose und Kohlensäure auf das Wachstum synchroner Chlorella-Kulturen, in "Beiträge der Botanik", Neue Folge Nr.1, S.205-216

SMILLIE,R.M., 1962: Photosynthetic and respiratory activities of growing pea leaves. Plant Physiol. 37, 716-721

Smillie,R.M., 1963: Formation and function of soluble proteins in chloroplasts. Can. J. Botany 41, 123-154

Ulrich,W., 1963: Vergleichende Untersuchungen an Euglena und Chlorella bei autotropher, mixotropher und heterotropher Ernährung. Dissertation, Göttingen

Wetherell,D.F., 1958: Obligate phototrophy in Chlamydomonas eugametos. Physiol. Plant. 11, 260-276

Wieland,Th. und G.Pfleiderer, 1963: Multiple Formen von Enzymen. Adv. enzymol. 25, 329-368

Wiessner,W. und A.Kuhl, 1962: Die Bedeutung des Glyoxylsäurecyclus für die Photoassimilation von Acetat bei phototrophen Algen, in "Beiträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik", Neue Folge Nr.1, S.102-108

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Pirson, danke ich für die Überlassung des Themas und für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei an dieser Stelle für apparative Unterstützung gedankt.

Lebenslauf

Am 10. Dezember 1935 wurde ich, Winfried Huth, als Sohn des Automechanikers Karl Huth und seiner Ehefrau in Schneidemühl (Pommern) geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1942 bis 1944 in Schneidemühl und ab 1945 in Erfurt. 1950 wurde ich in die Heinrich-Mann-Oberschule in Erfurt aufgenommen, an der ich bis zur Reifeprüfung 1955 blieb. Anschließend legte ich nach einem Sonderlehrgang für Ostzonenabiturienten in Berlin-West die Ergänzungsprüfung zum Abitur ab. Im Wintersemester 1956/57 nahm ich das Studium der Biologie an der Universität Göttingen auf, wo ich im Frühjahr 1961 am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität bei Herrn Prof. Dr. Pirson meine Doktorarbeit begann.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren: Professor Birukow, Professor Brockmann, Professor Deuticke, Professor Firbas, Professor Glemser, Professor Harder, Professor Hollmann, Professor Piepho, Professor Pirson, Professor Schlegel.